

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)**



**TESIS DOCTORAL**

**Ritmicidad diaria y estacional en el teleósteo "Tinca tinca" :  
implicaciones funcionales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Ana Isabel Guijarro Antón**

DIRECTORES:

**María Jesús Delgado Saavedra**  
**Nuria de Pedro Ormeño**

**Madrid, 2015**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5320957586

T 595.7

GU

cit

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**RITMICIDAD DIARIA Y ESTACIONAL EN EL TELEÓSTEO**  
***Tinca tinca*: IMPLICACIONES FUNCIONALES**



**ANA I. GUIJARRO ANTÓN**

**Madrid, Junio de 2004**

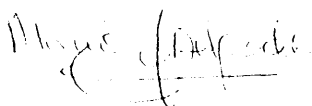
R 39366

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL II)

TESIS DOCTORAL

RITMICIDAD DIARIA Y ESTACIONAL EN EL TELEÓSTEO *Tinca tinca*:  
IMPLICACIONES FUNCIONALES

Vº Bº Directora




María Jesús Delgado Saavedra

Vº Bº Directora



Nuria de Pedro Ormeño

Doctoranda



Ana I. Guijarro Antón

Memoria presentada por Ana I. Guijarro Antón  
para obtener el grado de Doctora en Biología  
Madrid, Junio de 2004





Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de las Doctoras María Jesús Delgado Saavedra y Nuria de Pedro Ormeño gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia y Tecnología-Dirección General de Investigación (Proyectos AGL2001-0593 y BFI2001-1368) y a la Beca Predoctoral del Plan de Formación de Personal Universitario otorgada a la interesada por la Universidad Complutense de Madrid. Agradecimiento especial merece la donación desinteresada por el Centro Nacional de Cíprinicultura "Vegas del Guadiana", de parte de los animales utilizados en el presente trabajo.



A María Jesús

*Sin tu entusiasmo este trabajo jamás se hubiese concluido*

... Toda persona entusiasta posee una receptividad cósmica, universal, una capacidad de asimilarlo todo, de orientarse en todas las direcciones y de participar en todo con una vitalidad desbordante, y ello únicamente por la mera voluptuosidad de la realización y la pasión de actuar. El entusiasta ignora los criterios, las perspectivas, el cálculo; sólo conoce el abandono, el suplicio y la abnegación. La alegría de la realización, la ebriedad de la eficacia son las características esenciales de ese tipo humano, para el que la vida es un impulso que eleva a una altura en la que las fuerzas de destrucción pierden vigor. Todos tenemos momentos de entusiasmo, pero demasiado raramente para que puedan definirnos. Hablo de un entusiasmo a prueba de todo: el entusiasmo que no conoce en absoluto la derrota, pues no hace ningún caso del objeto y goza de la iniciativa y de la actividad como tal, el entusiasmo que se lanza a una acción no por haber meditado su sentido o su utilidad, sino porque no puede dejar de hacerlo. Sin serle obligatoriamente indiferentes, el éxito o el fracaso no estimulan ni disuaden nunca al entusiasta: él es la última persona del mundo que fracasa. La vida es mucho menos mediocre y fragmentaria en su esencia de lo que suele pensarse: ¿no es ésa la razón por la que no hacemos más que venir a menos, perder la vivacidad de nuestros impulsos e imponernos formas, esclerosándonos en detrimento de la productividad, del dinamismo interior? La pérdida de la fluidez vital destruye nuestra receptividad y nuestra capacidad de adherirnos generosamente a la vida. Sólo el entusiasta permanece vivo hasta la vejez: los demás, cuando no han nacido mortinatos -como la mayoría de la gente- mueren prematuramente. Nada más raro que un verdadero entusiasta... ¿Podríamos imaginar un mundo en el que todos los seres humanos estuviesen enamorados de todo? Sería un mundo más atractivo que la imagen misma del paraíso, puesto que el exceso de lo sublime y de la generosidad supera toda visión edénica. Las capacidades del entusiasta para renacer constantemente le sitúan más allá de las tentaciones demoníacas, del miedo a la nada y del martirio de la agonía. Su vida ignora lo trágico, pues el entusiasmo constituye la única forma de existencia que es enteramente opaca al sentimiento de la muerte. Incluso en la gracia - esa forma tan cercana al entusiasmo -, el desconocimiento, la indiferencia orgánica y la ignorancia irracional de la muerte tienen menos fuerza. Hay en la gracia mucho encanto melancólico, mientras que el entusiasmo carece totalmente de él. Mi admiración sin límites por los entusiastas proviene de mi incapacidad para comprender su existencia en un mundo donde la muerte, la nada, la tristeza y la desesperación componen un séquito siniestro. Que existan personas incapacitadas para la desesperación es algo que turba e impresiona.

E.M. Cioran



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, a la Dra. Mercedes Alonso Bedate el haberme acogido en su grupo de investigación, dándome así la oportunidad de conocer el mundo de la Ciencia y la Investigación, poniendo a mi disposición toda su experiencia. Además, me ha permitido incorporarme en un Departamento en el que he tenido la ocasión, a lo largo de todos estos años, de conocer a personas de las que profesionalmente y/o personalmente tengo mucho que aprender, y que me han aportado muchas cosas buenas.

Si alguien es responsable de que este trabajo llegara finalmente a término esa es la Profesora y codirectora de esta Tesis, María Jesús Delgado. María Jesús, has demostrado que con tu perseverancia, constancia y tenacidad puedes conseguir casi todo, por no decir todo, lo que te propones, hasta que alguien como yo escriba una tesis, cuando lo más sencillo hubiese sido tirar la toalla hace mucho tiempo y no complicarte la vida. Nunca podré agradecerte lo suficiente, ni creo que sepa hacerlo, todo el esfuerzo que has hecho, todas las horas, días, meses y años que me has dedicado, a costa, en muchas ocasiones, de renunciar al tiempo que deberías haber dedicado a tu familia, a tus amigos y, sobre todo, a ti misma. Creo que es un precio muy alto el que has pagado por que esto salga adelante, y probablemente no merezca la pena. Gracias por poner a mi servicio, y al de todos los que te rodean, además de tu tiempo, tu inteligencia, experiencia, tanto profesional como personal, conocimientos, sabiduría y habilidades pedagógicas, por enseñarme, o al menos intentarlo, a pensar. Gracias por no haber escatimado medios ni esfuerzo. Esta dedicación tuya a la ciencia es absolutamente generosa, y me atrevería a decir, sin riesgo de equivocarme, altruista, ¡ojalá hubiese mucha más gente como tu en la Universidad!, porque la Ciencia, según yo la veo, debe ser generosidad y altruismo. Gracias por mostrar siempre un entusiasmo y optimismo a prueba de fracasados, escépticos incorregibles y desesperados (ya sabes por quién lo digo). Quiero agradecerte especialmente tu preocupación constante por mi estado de ánimo. Gracias por utilizar ese sexto sentido que tienes para detectar los momentos críticos, momentos en los que pensaba que no merecía la pena seguir (y no es que aún no lo piense), por hablar conmigo (soy consciente de lo difícil que resulta y te pido perdón por ello), por intentar hacerme creer que valgo para esto, por animarme incansablemente a seguir adelante. Por último, quiero darte las gracias por ser mucho más que la directora de esta tesis, por haberme permitido conocerte, creo que eres un ser humano excepcional, y por poder considerarte como una amiga. Quiero aprovechar también para pedirte disculpas por las ocasiones en que he sido ingrata e injusta contigo, lo siento

mucho porque no lo mereces. Lo mínimo que podía hacer para agradecerte todas estas cosas es no abandonar y acabar el trabajo. Te lo debo.

Las relaciones humanas son muy complicadas, de modo que en ocasiones los intereses encontrados crean diferencias prácticamente insalvables y verdaderamente dolorosas cuando hacen que se pierda una relación preexistente considerada como muy buena. Sin embargo, afortunadamente con buena voluntad por ambas partes, se puede lograr un acercamiento que beneficie a todos y haga más llevadero el trabajo en común. Quiero agradecer a la Dra. Nuria de Pedro el haber puesto de su parte esa buena voluntad, poniendo a mi disposición su gran inteligencia y todos sus conocimientos, que son muchos, en la etapa final de esta tesis. Muchas gracias por tu ayuda y por ser un ejemplo de eficacia como no he conocido otro, ni creo que conozca nunca. En este sentido siempre serás un referente para mí.

Marcos, creo que no es necesario que te diga todo lo que tengo que agradecerte porque tú ya lo sabes, pero aún así quiero hacerlo. Tu apoyo a lo largo de todos estos años, que son muchos, ha sido indispensable para poder realizar este trabajo, que aunque lleva mi firma (por las circunstancias que tu y yo tan bien conocemos) es tan tuyo como mío. Y ésta no es una frase hecha, me remito a todo el tiempo y el esfuerzo que has invertido para que esto saliera adelante. Ha sido un apoyo tanto en lo profesional como en lo personal. En lo profesional, porque prácticamente todos los experimentos de este trabajo los hemos hecho juntos, prestándome una ayuda que no tiene precio, haciendo que el trabajo sea más sencillo, llevadero y divertido. La pena es que todo el ingenio desplegado durante las interminables horas de trabajo no se haya plasmado en algo a lo que le podamos sacar fruto, aunque quizá, si la memoria no nos falla, aún estemos a tiempo (tú ya sabes a lo que me refiero). En el aspecto personal tengo tantas o más cosas que agradecerte. Comenzaste, hace una eternidad, siendo un compañero de trabajo al que no conocía, para convertirte en poco tiempo en uno de mis mejores amigos, esa clase de amigos con los que puedes contar siempre y que estarán ahí durante toda la vida, estando a mi lado tanto en los buenos momentos (recuerdo con cariño y nostalgia aquellas gloriosas etapas del Tour y los partidos del mundial y de la Liga de Campeones, los comentarios de la jornada de liga en el café de los lunes, la "Modelos", "Bestia", "la mujer cofre", el banco de Paco, ...), compartiéndolos y haciéndolos aún mejores, como en los periodos difíciles que siempre surgen a lo largo de la realización de la Tesis, cuando todo se te viene encima, eres presa del aburrimiento existencial y cansancio mental más absolutos y no encuentras una salida (aun en el caso de tener las ganas necesarias para buscarla), y estás, como dice el gran maestro Emile

M. Cioran, "en las cimas de la desesperación". En esos momentos te he encontrado siempre, dispuesto a escuchar y compartir tus pensamientos y reflexiones, y a animarme a seguir adelante intentando hacerme ver que merecía la pena, aunque en el fondo tu tampoco estuvieses muy convencido de ello.

Ángel Luis, muchas gracias por estar siempre dispuesto a solucionar los problemas prácticos, dando consejos siempre acertados y aclarando las dudas matemáticas, por tus enseñanzas teóricas, y como no, por aportar soluciones eficaces a los problemas informáticos que suelen presentarse en los momentos más críticos, cuando el tiempo se agota, y a los problemas causados tan a menudo por ese viejo y querido amigo, el HPLC. Gracias por poner al servicio de todos ese cerebro tan privilegiado que tienes. Quiero agradecerte además el haber compartido durante los cafés de la sobremesa tu humor tan característico, ese humor tan negro e incisivo que tanta gracia me hace.

Esther, muchas gracias por la ayuda siempre desinteresada (o mejor dicho, completamente interesada en que todo salga bien para evitar una nueva decepción) que me has prestado dentro del laboratorio, pero sobre todo por hacerme saber y demostrarme que puedo contar contigo para hablar y pedirte consejo, y no sólo en temas de trabajo. Admiro tu capacidad de trabajo y la forma que tienes de transmitir el entusiasmo por lo que haces. También quiero darte las gracias por tu rebeldía, por tu espíritu de lucha y por la valentía con la que defiendes aquello en lo que crees, y por hacerme comprender que desde la pasividad no se consigue nada. Sólo con gente como tú se puede hacer que el mundo cambie, aunque sea muy poco a poco.

Marina, muchas gracias por tu habitual, generosa y desinteresada disposición a echar una mano en el trabajo, en cualquier momento, sin importar la hora o el día. Muchas gracias por tu buen humor y alegría, y por contagiar esa alegría a los que te rodean. Muchas gracias también por intentar hacer que vea las cosas de otra forma, por hacerlo todo más sencillo y por mostrarme cómo disfrutar un poco más de la vida. Te agradezco especialmente el estar siempre dispuesta a escucharme y soportar mis rollos mentales, tu paciencia casi inagotable, tu comprensión y confianza. Muchas gracias, no sólo por pensar que merezco la pena, sino también por demostrármelo constantemente (no sabes lo equivocada que estás), y por intentar, sin descanso, que yo lo crea. Quiero agradecerte también los muy buenos momentos que hemos compartido en el trabajo y sobre todo fuera de él. Espero que podamos seguir haciéndolo durante mucho tiempo.

Marisa, muchas gracias por toda la ayuda que me has prestado, sobre todo al principio, cuando entré a formar parte del grupo, y por todo el tiempo que me has

dedicado. Muchas gracias también por toda la diversión, que fue mucha, compartida en los viejos tiempos.

Quiero agradecerlos en general a todos los miembros del grupo vuestra ayuda en los ciclos, sin la cual hubiese sido imposible realizar esta Tesis. Gracias por estar ahí, una y otra vez, consiguiendo que resultasen incluso divertidos (es muy curioso cómo, con la perspectiva del tiempo, las cosas se ven muy diferentes y ahora recuerdo con mucho cariño y algo de nostalgia todos esos momentos). Gracias por soportarme durante más de 24 h seguidas, se que tiene mucho mérito, y por aguantar el humor negro y muy corrosivo del que, tanto Marcos como yo, hacíamos gala incansablemente durante las interminables horas, casi hasta el punto de acabar con vuestra paciencia. Quiero dar las gracias también a Ángeles y a Aintzane, porque durante el tiempo que estuvieron con nosotros demostraron siempre estar dispuestas a prestar su ayuda. Me alegro, sinceramente, de haberos conocido, y siento mucho que por las circunstancias de la vida no hayáis podido seguir en esto, porque creo que tanto personal como profesionalmente merecéis la pena.

Ricardo, gracias por ser como eres, inteligente, divertido, brillante y por compartir todas estas cualidades con los demás. Gracias por ser un gran conversador, es muy enriquecedor hablar con alguien con tanta cultura (la educación en un colegio como es debido siempre se nota, con alguna excepción que confirma esa regla).

Alberto, gracias por dar ejemplo de cómo es un trabajador incansable. Creo que jamás has cedido a la pereza, y eso es algo de lo que todos deberíamos aprender. Pienso además que, junto a Ricardo, eres una de las personas más inteligentes y cultas que he conocido. “Con gente como tú estoy segura de que nuestra CASTILLA volverá a ser grande”.

Cristina, muchas gracias por saber, y sobre todo, por querer escuchar. Para mí ha sido de gran ayuda tenerte cerca en los peores momentos de la realización de esta Tesis. Muchas gracias por tu comprensión y por tus consejos.

A todos vosotros en general por crear un ambiente en el laboratorio inmejorable, en el que se respiraba además de mucho trabajo, respeto, cariño, amistad, comprensión y sobre todo mucha diversión. Muchas gracias por hacer entre todos que los malos momentos no lo fuesen tanto y por mejorar aún más los buenos momentos. En este grupo, por supuesto incluyo a Eva, que últimamente ha compartido muchas horas con nosotros, aportando alegría y buen humor, y por tener siempre una sonrisa, es muy agradable, te lo aseguro. Gracias por tu preocupación por mí y por el desarrollo de este



trabajo. También quiero incluir aquí a Luisa, eres genial, y a Rosa, que tiene la rara habilidad en estos tiempos de transmitir paz, tranquilidad y sosiego.

Elvira, ¿cómo agradecer una amistad tan sincera y profunda como la tuya?. Eres una de las mejores personas que he conocido, generosa, inteligente, trabajadora, con un gran corazón y, por encima de todo, muy leal, en ocasiones, demasiado, hasta el punto de perjudicarte a ti misma por no dejar en la estacada a otros que no han sabido o no han querido agradecértelo como deberían. Es una pena que no todo el mundo haya sabido apreciar y valorar todas estas cualidades, hay que estar muy ciego o ser muy tonto para no verlo. Sé que siempre estarás ahí cuando necesite una verdadera amiga, y eso es algo que no tiene precio. Muchas gracias por tus consejos, que deberías haberte aplicado tu también, pero ya sabes que los tres somos expertos en darnos consejos mutuamente y no aplicarnos ninguno, es nuestro deporte favorito. Muchas gracias por tu continuo interés por la marcha de esta Tesis, creo que, en realidad, tú has tenido mucho más empeño que yo en que la terminase. Gracias por estar siempre pendiente de mi estado de ánimo y por, con tu optimismo, intentar convencerme de que todo el tiempo invertido en esto servirá para algo. Quiero agradecerte también todos los buenos ratos que hemos compartido y espero que sigamos durante mucho más tiempo compartiendo buenos momentos. Creo que el único modo de agradecerte todo esto es brindarte una amistad sin condiciones. Espero haber estado y estar a la altura que corresponde.

Paz, muchas gracias por tratarme siempre tan bien, por tu amabilidad, por tu cariño, apoyo y preocupación constantes. Es muy agradable sentirse querida. Gracias también por los buenos ratos compartidos durante las comidas y los cine-forum en los viejos tiempos, fue muy divertido.

Quiero agradecer a Mercedes Hernández, a Chicky y especialmente a Isabel vuestro sincero interés y preocupación por la marcha de esta Tesis, y más importante aún por mi estado de ánimo. Gracias por intentar ayudarme, por vuestros consejos y el apoyo y los ánimos que siempre me habéis dado.

Al resto de la gente que trabaja o ha trabajado en el Departamento, Mónica López, Noelia, Sonia, Marta, Pedro, Carmen, Isabel, María, etc, por crear un ambiente agradable y cordial. Milagros, gracias por las entretenidas conversaciones sobre gatos que hemos mantenido tantas veces, y sobre todo muchas gracias por darme a mi gatita, Allegra, que es una de las mejores cosas que me han pasado en los últimos tiempos.

Julia, muchas gracias por hacer tan bien tu trabajo, que es tan importante como el de cualquiera de los que trabajamos en el laboratorio. Por tu paciencia con nosotros por

tener siempre las mesas desordenadas y llenas de papeles, y por que sé que me aprecias. Quiero que sepas que es algo mutuo.

A Fernando y a Rafa, quiero agradecer vuestra ayuda para solucionar los problemas técnicos.

Tere y Lola, muchas gracias por facilitar y agilizar a burocracia que conllevan el doctorado y la tesis. Sin vuestra ayuda ésta labor hubiese sido todavía más ardua. Gracias por vuestra eficacia en el trabajo y sobre todo por vuestra amabilidad.

Quiero agradecer a Paco Bermejo (ETSIA, universidad Politécnica de Madrid) el cuidado de las tencas utilizadas en esta Tesis, y a el “Centro Nacional de Ciprinicultura Vegas del Guadiana” (Badajoz) la donación desinteresada de las tencas.

Javi, gracias por demostrarme que a pesar de la distancia siempre estarás ahí para lo que necesite. Gracias por tener la habilidad de hacer que todo el tiempo pasado sin mantener contacto se diluya en un instante, y todo vuelva a ser como en los viejos y buenos tiempos de la carrera en los que aprendí tanto de ti, y compartimos tan buenos momentos y la ilusión de poder dedicarnos a esto de la Investigación.

A Nuria Sandoval, gracias por la sólida y sincera amistad que perdura después de tantos años sin resquebrajarse en ningún momento. Eres un valor seguro en mi vida.

Al resto de la gente a la que aprecio, Berta, Gemma, Santi, quiero daros las gracias por vuestro cariño, y pedir os disculpas por haberos tenido un poco abandonados, sobre todo en los últimos tiempos. Os prometo que voy a intentar rectificar, porque sois gente que merece mucho la pena.

Chus, muchas gracias por estar siempre ahí, por tu ayuda incondicional, generosa y sin límites en todos los aspectos de la vida. Gracias por soportarme a diario, nunca podré explicarme cómo lo consigues si ni yo misma puedo, por aguantar mi mal humor y, sobre todo en los últimos tiempos, mi gran egoísmo, del que me arrepiento sinceramente. Gracias por aguantar mi pesimismo, sé que llega a ser agotador. Siento sinceramente no haberte correspondido como mereces, creo que no he estado a la altura de las circunstancias y no te he prestado el apoyo que necesitabas. Espero que puedas perdonarme, estoy segura de que lo harás, no porque yo lo merezca, sino porque eres generosa y muy buena persona, y me lo demuestras continuamente.

Inma, muchas gracias por tu confianza sin límites en mi capacidad para sacar esto adelante. Gracias por creer en mí. Gracias también por tus consejos, basados en la

experiencia, y por demostrarme que con fuerza de voluntad y constancia se pueden alcanzar los objetivos planteados. Creo que afortunadamente tu labor como "coach" ha dado resultado.

A mis padres, por haber sido siempre un ejemplo de honradez, trabajo, cumplimiento del deber, voluntad, sacrificio, generosidad y abnegación. Por vuestro constante apoyo. Quiero agradecerlos todo lo que me habéis enseñado y todo lo que he compartido con vosotros. Sólo me habéis dado cosas buenas, todo lo malo que llevo dentro es de mi propia cosecha. Siento haberos respondido en ocasiones con ingratitud y malos modos, es imperdonable.

Al resto de mi familia y muy especialmente a Cristina, a mi tía Celi y a mi tío David, por su apoyo incondicional y por el cariño que me demuestran continuamente. A María, que una más de la familia, porque sé lo mucho que me aprecia, y a mis tías Mari y Anselma y a mis primas Trini y Helena, por los buenos ratos compartidos en los calurosos veranos castellanos.



## ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácidos.
<b>A<sub>0</sub></b>	Nivel medio o mésar.
<b>A<sub>1</sub></b>	Amplitud sinusoidal.
<b>AA-NAT</b>	Arlalquilamina-N-acetiltransferasa.
<b>act. esp.</b>	Actividad específica.
<b>AD</b>	Adaldehído deshidrogenasa.
<b>AR</b>	Aldehído reductasa.
<b>Ag-RP</b>	“Agouti-related protein”.
<b>ARC</b>	Núcleo arqueado del hipotálamo.
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleíco mensajero.
<b>CART</b>	Tránsito regulado por anfetaminas y cocaína.
<b>CCK</b>	Colecistokinina.
<b>CCMH</b>	Concentración corpuscular media de hemoglobina.
<b>COMT</b>	Catecol-O-metiltransferasa.
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de corticotropina.
<b>DAβOH</b>	Dopamina-β-hidroxilasa.
<b>D</b>	Oscuridad.
<b>DD</b>	Oscuridad constante.
<b>DA</b>	Dopamina.
<b>DOPAC</b>	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
<b>e.e.m.</b>	Error estadístico de la media.
<b>FEO</b>	“Food entrainable oscillator”.
<b>GAL</b>	Galanina.
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento.
<b>GHRH</b>	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento.
<b>GHS-R</b>	Receptor de los secretagogos de la hormona del crecimiento.
<b>GHSs</b>	Secretagogos de la hormona del crecimiento.
<b>GSI</b>	Índice gonadosomático.
<b>Hb</b>	Hemoglobina.
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular media.
<b>HIOMT</b>	Hidroxindol-O-metiltransferasa.
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad.
<b>HMPG</b>	4-hidroxi-3-metoxifenilglicol.

<b>HPLC-ED</b>	Cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica.
<b>HSI</b>	Índice hepatosomático.
<b>Htc</b>	Hematocrito.
<b>IN</b>	Índice nutricional.
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato.
<b>ISO</b>	Isoproterenol.
<b>Kd</b>	Constante de disociación.
<b>L-AAAD</b>	L- Aminoácido aromático descarboxilasa.
<b>L</b>	Luz.
<b>LL</b>	Iluminación constante.
<b>LEO</b>	"Light entrainable oscillator".
<b>MAO</b>	Monoamino oxidasa.
<b>MCH</b>	Hormona concentradora de los melanóforos.
<b>MD</b>	Mitad de la fase oscura.
<b>MEL</b>	Melatonina.
<b>ML</b>	Mitad de la fase luminosa.
<b>NA</b>	Noradrenalina.
<b>NM</b>	Normetanefrina.
<b>NPV</b>	Núcleo paraventricular hipotalámico.
<b>NPY</b>	Neuropéptido Y.
<b>NSQ</b>	Núcleo supraquiasmático.
<b>Ob-R</b>	Receptor de leptina.
<b>p</b>	Significación estadística.
<b>PEMT</b>	Feniletanolamina-N-metiltransferasa.
<b>PKC</b>	Proteína kinasa C.
<b>POMC</b>	Pro-opiomelanocortina.
<b>PRL</b>	Prolactina.
<b>r</b>	Coeficiente de correlación.
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central.
<b>t</b>	Tiempo.
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa.
<b>Tir</b>	Tirosina.
<b>TPH</b>	Triptófano hidroxilasa.
<b>VCM</b>	Volumen corpuscular medio.
<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo.
<b>φ</b>	Fase.

$\tau$

Periodo.

**5-HIAA**

Ácido 5-hidroxiindol acético.

**5-HT**

5-hidroxitriptamina o serotonina.

**5-MT**

5-metoxitriptamina.

**5-MIAA**

Ácido 5-metoxindolacético.

**5-MTFOL**

5-metoxitriptofol.





# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. LA TENCA: CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE .....</b>	<b>2</b>
<b>2. RITMICIDAD EN PECES .....</b>	<b>5</b>
2.1. GENERALIDADES.....	5
2.2. SISTEMA CIRCADIANO. OSCILADORES.....	7
2.2.1. Complejo pineal y retina .....	9
2.3. RITMOS EN HEMATOLOGÍA .....	11
2.4. RITMICIDAD DE LAS RESERVAS METABÓLICAS .....	14
2.5. RITMOS DE ACTIVIDAD .....	16
2.6. RITMOS DE ALIMENTACIÓN.....	17
<b>3. RITMOS DE REGULADORES DE LA INGESTA .....</b>	<b>19</b>
3.1. GHRELINA.....	19
3.1.1. Estructura.....	19
3.1.2. Distribución .....	22
3.1.3. Receptores de los secretagogos de la GH (GHS-R) y mecanismos de acción .....	22
3.1.4. Actividades biológicas. Regulación de la ingesta y el estado nutricional.....	23
3.1.5. Ritmos anuales y diarios .....	24
3.2. NEUROPEPTIDO Y .....	25
3.2.1. Estructura.....	25
3.2.2. Distribución .....	26
3.2.3. Receptores y mecanismo de acción.....	27
3.2.4. Actividades biológicas. Regulación de la ingesta y el estado nutricional.....	29
3.2.5. Ritmos anuales y diarios .....	30
3.3. LEPTINA.....	31
3.3.1. Estructura.....	31
3.3.2. Distribución .....	31
3.3.3. Receptores y mecanismos de acción .....	32

3.3.4. Actividades biológicas. Regulación de la ingesta y el estado nutricional .....	33
3.3.5. Ritmos anuales y diarios .....	34
3.4. MONOAMINAS ENCEFÁLICAS .....	35
3.4.1. Síntesis y degradación.....	35
3.4.2. Distribución .....	38
3.4.3. Receptores .....	38
3.4.4. Actividades biológicas. Regulación de la ingesta .....	39
3.4.5. Ritmos anuales y diarios .....	40
3.5. INTERACCIONES ENTRE DISTINTOS REGULADORES DE LA INGESTA .....	41
<b>4. MELATONINA.....</b>	<b>45</b>
4.1. SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN .....	46
4.2. SECRECIÓN .....	48
4.3. RECEPTORES DE MELATONINA .....	49
4.4. REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA.....	51
4.4.1. Regulación por la luz .....	51
4.4.2. Regulación por la temperatura.....	51
4.4.3. Regulación por la alimentación .....	52
4.4.4. Control endógeno .....	53
4.5. LA MELATONINA COMO SEÑAL FOTOPERIÓDICA.....	53
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>
<b>1. MATERIALES .....</b>	<b>59</b>
1.1. PRODUCTOS.....	59
1.1.1. Reactivos .....	59
1.1.2. Kits comerciales.....	61
1.2. EQUIPOS E INSTRUMENTAL .....	61
1.3. MATERIAL BIOLÓGICO: OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO.....	62

<b>2. MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
2.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....	63
2.1.1. Sangre y plasma .....	63
2.1.2. Hígado.....	64
2.1.3. Músculo.....	64
2.1.4. Gónadas.....	64
2.1.5. Copas ópticas y retinas .....	64
2.1.6. Hipotálamo y telencéfalo .....	65
2.2. ÍNDICES Y PARÁMETROS BIOMÉTRICOS.....	66
2.2.1. Índice hepatosomático (HSI) y gonadosomático (GSI) .....	66
2.2.2. Índice nutricional (IN) .....	66
2.3. TÉCNICAS HEMATOLÓGICAS .....	66
2.3.1. Determinación de hemoglobina en sangre .....	66
2.3.2. Determinación del hematocrito.....	67
2.3.3. Recuento total de células sanguíneas .....	67
2.3.4. Recuento diferencial de glóbulos blancos .....	68
2.3.5. Cálculo de índices corpusculares .....	70
2.4. TÉCNICAS COLORIMÉTRICAS .....	71
2.4.1. Valoración del colesterol plasmático.....	71
2.4.2. Valoración de la glucosa plasmática.....	72
2.4.3. Valoración de los triglicéridos plasmáticos .....	73
2.4.4. Valoración del glucógeno .....	74
2.4.5. Valoración de lípidos totales.....	75
2.4.6. Determinación de proteínas totales .....	76
2.5. TÉCNICAS RADIOENZIMÁTICAS.....	77
2.5.1. Determinación de la actividad AA-NAT.....	77
2.6. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS (CROMATOGRAFÍA	
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN, HPLC).....	80
2.6.1. Principios generales del ensayo .....	80
2.6.2. Cuantificación de melatonina mediante HPLC-ED.....	81
2.6.3. Cuantificación de monoaminas hipotalámicas y sus	
metabolitos mediante HPLC-ED.....	84

2.7. TÉCNICAS RADIOINMUNOLÓGICAS (RIA) .....	86
2.7.1. Criterios de validez del RIA .....	86
2.7.2. Principios generales del ensayo .....	87
2.7.3. Determinación del contenido encefálico de NPY y de los niveles plasmáticos de ghrelina .....	88
2.7.4. Determinación de los niveles circulantes de leptina .....	90
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	92
2.8.1. Análisis de regresión lineal .....	92
2.8.2. Análisis de la varianza (ANOVA) y test de comparaciones múltiples .....	92
2.8.3. Análisis sinusoidal .....	92
2.8.4. Test <i>t de Student</i> .....	93
2.8.5. Grados de significación .....	93
2.9. DISEÑOS EXPERIMENTALES .....	94
2.9.1. Variaciones diarias y estacionales en la hematología, bioquímica plasmática y reservas metabólicas en <i>Tinca tinca</i> .....	94
2.9.2. Variaciones diarias y estacionales en el contenido hipotalámico y telencefálico de NPY y monoaminas y en los niveles plasmáticos de ghrelina y leptina en <i>Tinca tinca</i> .....	96
2.9.3. Contenido de melatonina y actividad AA-NAT en el tejido ocular de la tenca .....	98
a) Variaciones diarias y estacionales en el contenido ocular de melatonina y la actividad AA-NAT en la retina neural de la tenca .....	98
b) Papel de la temperatura en la regulación del contenido ocular de melatonina y de la actividad AA-NAT en la tenca .....	98
c) Estudio del posible carácter endógeno de la síntesis rítmica de melatonina y de la actividad AA-NAT ocular en la tenca .....	99
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>100</b>
<b>1. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN LA HEMATOLOGÍA, BIOQUÍMICA PLASMÁTICA Y RESERVAS METABÓLICAS EN <i>Tinca tinca</i> .....</b>	<b>101</b>
1.1. ESTUDIO HEMATOLÓGICO .....	101

1.2. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN LA BIOQUÍMICA PLASMÁTICA .....	117
1.3. VARIACIONES ESTACIONALES DE LOS ÍNDICES BIOMÉTRICOS .....	119
1.4. CAMBIOS DIARIOS Y ESTACIONALES EN LAS RESERVAS METABÓLICAS .....	124
<b>2. VALIDACIÓN DE LOS RIAS DE NPY, GHRELINA Y LEPTINA .....</b>	<b>141</b>
2.1. NPY .....	141
2.2. GHRELINA.....	143
2.3. LEPTINA.....	143
<b>3. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN EL CONTENIDO HIPOTALÁMICO Y TELENCEFÁLICO DE NPY Y EN LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LEPTINA Y GHRELINA EN <i>Tinca tinca</i>.....</b>	<b>146</b>
<b>4. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN EL CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE MONOAMINAS EN <i>Tinca tinca</i> .....</b>	<b>150</b>
<b>5. CONTENIDO DE MELATONINA Y LA ACTIVIDAD AA-NAT EN EL TEJIDO OCULAR DE <i>Tinca tinca</i> .....</b>	<b>170</b>
5.1. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES .....	170
5.2. PAPEL DE LA TEMPERATURA EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD AA-NAT Y DEL CONTENIDO DE MELATONINA OCULAR EN LA TENCA.....	173
5.3. ESTUDIO DEL POSIBLE CARÁCTER ENDÓGENO DE LA SÍNTESIS RÍTMICA DE MELATONINA Y DE LA ACTIVIDAD AA-NAT EN TEJIDO OCULAR DE LA TENCA .....	177
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>178</b>
<b>1. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN LA HEMATOLOGÍA.....</b>	<b>179</b>
1.1. SERIE ROJA.....	179
1.2. SERIE BLANCA.....	183
<b>2. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN LA BIOQUÍMICA PLASMÁTICA Y LAS RESERVAS METABÓLICAS EN <i>Tinca tinca</i>.....</b>	<b>186</b>
2.1. ÍNDICES BIOMÉTRICOS.....	187

2.2. PROTEÍNAS.....	188
2.3. LÍPIDOS.....	192
2.4. CARBOHIDRATOS.....	196
 <b>3. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN EL CONTENIDO HIPOTALÁMICO Y TELENCEFÁLICO DE NPY Y MONOAMINAS Y EN LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GHRELINA Y LEPTINA EN <i>Tinca tinca</i> .....</b>	 <b>201</b>
3.1. NPY .....	201
3.2. GHRELINA .....	208
3.3. LEPTINA .....	212
3.4. MONOAMINAS.....	220
 <b>4. CONTENIDO DE MELATONINA Y DE ACTIVIDAD AA-NAT EN EL TEJIDO OCULAR DE <i>Tinca tinca</i>.....</b>	 <b>227</b>
4.1. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES. PAPEL DE LA TEMPERATURA.....	230
4.2. CARÁCTER ENDÓGENO DE LA SÍNTESIS RÍTMICA DE MELATONINA Y DE LA ACTIVIDAD AA-NAT .....	235
 <b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	 <b>240</b>
 <b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	 <b>243</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**





## 1. LA TENCA: CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE.

La tenca, *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758), es un teleósteo perteneciente al Orden Cipriniformes, Familia *Ciprinidae* y Subfamilia *Leuciscinae*. Es una especie originaria de Europa que ha sido posteriormente introducida para su cultivo y su pesca deportiva en cursos fluviales de otros continentes (Australia, Nueva Zelanda, África, Norteamérica, sudeste asiático y Brasil) (Lukovicz y Proske, 1979). Presenta una amplia distribución habitando ríos, lagos y estanques de Europa (a excepción de Escocia, Escandinavia central y septentrional, península balcánica meridional y suroccidental y Córcega) y de Asia centroccidental, desde el nivel del mar hasta 2.078 m en los Alpes y a 1.818 m en los Apeninos.

Su cuerpo es alargado y robusto y el pedúnculo caudal corto y alto con una aleta caudal grande, lo que le confiere una gran agilidad natatoria (Fotografía 1). La piel es mucosa con escamas cicloides muy pequeñas. La coloración varía desde verdosa a parda dependiendo del medio. Así, el dorso y los flancos pueden ser pardo negruzcos, pardo verdosos o verdosos, con reflejos dorados sobre todo en los flancos. El vientre es amarillento o blanquecino, con posibles reflejos rosa, naranja o rojizo. Las aletas son de color pardo negruzco, pardo verdoso, pardo o, más raramente, pardo con reflejos rosados. Se conocen variedades con librea amarillo dorada y manchas negras, librea grisácea, y color habitual pero con manchas blancas. Sus aletas no presentan radios espinosos. La boca es pequeña, terminal y protractil, con labios gruesos que presentan un par de barbillones en sus comisuras. Los ojos son pequeños, con el iris rojizo o amarillento. Los ápices de las aletas son redondeados. La aleta dorsal tiene entre 12 y 13 radios (4 indivisos y 3-9 divididos) y la anal entre 9 y 12 (3-4 indivisos y 6-8 divididos). La tenca presenta un claro dimorfismo sexual, siendo las aletas pelvianas de los machos más grandes que las de las hembras y con el primer radio típicamente engrosado y un "callo" característico en el punto de inserción (Fotografía 2). A partir de los 2 años, cuando los machos miden aproximadamente 12 cm, estas aletas ventrales llegan hasta el ano o lo superan ligeramente.

En Europa Central la tenca alcanza la madurez sexual a los 2-3 años en el caso de los machos y a los 2 ó 3-4 años en el caso de las hembras, pero en España las hembras pueden alcanzar la madurez al año (Steffens, 1995). La reproducción en la tenca ocurre en aguas con abundante vegetación y a temperaturas de 19-20°C, produciéndose en España, de forma general, entre primavera y verano (finales de mayo-finales de julio) (Pinillos y cols., 2003), si bien depende de forma importante de la temperatura, pudiéndose prolongar en veranos fríos durante el mes de agosto. El límite superior de



**Fotografía 1.** Individuo adulto de tenca (*Tinca tinca*).

temperatura para la freza es 29°C y el inferior 19-20°C (Steffens, 1995). Las hembras ponen unos 200.000 huevos por kilo de peso en varios desoves (en general hay 3 ó 4 puestas en cada estación reproductora), espaciados unos de otros aproximadamente 2 semanas, durante todo el periodo reproductivo. El número de huevos depositados en cada estación reproductora depende de varios factores entre los que cabe destacar la temperatura del agua (Morawska, 1981), así como el tamaño, la edad y la tasa de crecimiento de las hembras (Kubů y Kouřil, 1985). El tamaño de los huevos depende del tamaño de los progenitores (Brylińska y Długosz, 1978), aunque en general son pequeños (0,8-1 mm de diámetro), verdosos y se depositan en grupos sobre plantas acuáticas o en el fondo del río. Las larvas eclosionan al cabo de 2-8 días y miden 4-5 mm. La mortalidad en el primer año en cultivos extensivos es muy elevada (90%) debido a la gran depredación a la que están sometidos los huevos y las larvas (Horvath y cols., 1984).



**Fotografía 2.** Dimorfismo sexual en la tenca. Aletas pelvianas de un macho (izquierda) y de una hembra (derecha) adultos. (Fotografía. M.A. López Patiño).

En comparación con otras especies de peces, la tenca tiene un crecimiento lento, tanto en libertad como en cultivo (Von Lukowicz y cols., 1986). Las tasas de crecimiento varían no sólo dependiendo de la temperatura y la alimentación, sino también del

genotipo (Steffens, 1995). En general, en el primer verano, no llegan a los 10 g de peso, alcanzando entre 3 y 5 gramos; en el segundo verano suelen pesar 30-100 g, y entre 200 y 400 g en el tercer verano (Steffens, 1995). Aunque excepcionalmente puede vivir hasta 20 años y alcanzar 3,5-4 Kg de peso y 70 cm de longitud, es una especie de tamaño medio que suele medir entre 25-30 cm y pesar entre 600 g y 2 Kg, y no suele vivir más de 10 años.

Su hábitat característico son los fondos de estanques y charcas de agua dulce con fondos blandos y temperaturas estivales elevadas (por encima de los 19-20°C) y con vegetación abundante, aunque también está presente en algunos ríos de curso lento, agregándose en pequeños grupos generalmente antes de la época de freza. Su dieta es omnívora, consistiendo sobre todo en algas macrófitas, larvas de insectos acuáticos, pequeños gasterópodos y moluscos bivalvos (*Bithynia*, *Valvata* y *Pisidium*). Al comienzo de la alimentación exógena (3-4 días después de la eclosión, dependiendo de la temperatura) las larvas de tenca se nutren de protozoos y pequeños rotíferos (*Brachionus calyciflorus* y *B. angularis*) (Von Lukowicz y cols., 1986). Sin embargo, el uso de *Artemia nauplii* como primera fuente de alimento da buenos resultados en términos de tasas de crecimiento y supervivencia (Wolnicki y Gómy, 1995; Quirós y Alvariño, 2000). Posteriormente se alimentan de rotíferos de mayor tamaño, como *Asplanchna*, y a las 2 semanas de vida (1,1-1,2 cm), de pequeños cladóceros (*Moina rectirostris* y especies relacionadas). Al aumentar de tamaño, las tencas se alimentan de ostrácodos, cladóceros y copépodos de mayor tamaño, así como de ácaros acuáticos y, especialmente, de larvas de quironómidos. Carece de estómago y la boca conecta directamente con el intestino, que representa el 93,8% de la longitud estándar (Adámek y cols., 2003).

La tenca se caracteriza por su alta resistencia a condiciones ambientales adversas, su elevada plasticidad ecológica y su notable resistencia frente a distintas enfermedades. Tiene una gran tolerancia a calidades del agua bajas y niveles de oxígeno muy escasos, siendo capaz de soportar periodos de hipoxia prolongados, especialmente a bajas temperaturas. Sin embargo, es una especie que muestra una alta sensibilidad al estrés, y en condiciones de cultivo controladas, a menudo deja de alimentarse como consecuencia de la introducción de perturbaciones exógenas (Fleig y Gottschalk, 2001). En estas condiciones la tasa de crecimiento de la tenca es muy baja (Wolnicki y Myszkowski, 1998).

El sistema de cultivo conocido como "tradicional" ha sido practicado en Centroeuropa desde la Edad Media y en España desde el siglo XVI. Consiste en la estabulación de individuos de ambos sexos en charcas de poca profundidad y con

vegetación. Se obtiene así una mezcla de individuos adultos y juveniles de varios tamaños que deben ser separados manualmente. Los adultos pueden ser utilizados para la venta, mientras que los juveniles son trasladados a otros estanques para continuar su crecimiento. Actualmente este sistema de cría aún se practica en explotaciones ganaderas (charcas extensivas) en Extremadura (la provincia de Cáceres es la mayor productora de tencas de España) y de forma casi testimonial en Castilla y León (Segovia y Salamanca). Las dos charcas más famosas en España, ubicadas en Casar de Cáceres (Cáceres) y Brozas (Cáceres), y pertenecientes a la Mancomunidad de Municipios "Tajo-Salor", no han cambiado su sistema de cría tradicional desde su construcción hace más de 3 siglos. La única mejora que se ha introducido en el proceso consiste en trasladar los alevines producidos en el año desde las charcas de reproducción, que son más profundas y con abundante vegetación, a charcas de menor profundidad y sin vegetación. La pesca final se realiza a medida que las charcas se van secando, siendo este factor el que determina la estacionalidad del mercado, con una talla comercial entre 80-150 g, y tardando casi dos años en alcanzar este tamaño. La cría intensiva de juveniles de tenca en condiciones ambientales controladas o semicontroladas puede ser una alternativa importante a la producción tradicional de esta especie. Sin embargo, el lento crecimiento de las tencas alimentadas con pienso comercial determina que los cultivos intensivos aún sean insuficientes (Sierra y cols., 1995; Jover y cols., 1997; Wolnicki y Myszkowski, 1998), por lo que es conveniente la adición de alimento vivo (por ej. *Daphnia*) a la comida seca, lo que incrementa tanto el crecimiento como la tasa de supervivencia de los juveniles, en comparación con las tencas que reciben únicamente el alimento seco (Quirós y Alvariño, 2000; Wolnicki y cols., 2003).

A pesar de tratarse de una especie de creciente interés comercial en Europa central e importante en la pesca deportiva en otras áreas continentales, los conocimientos sobre su biología y los requerimientos para su producción son todavía muy limitados.

## 2. RITMICIDAD EN PECES.

### 2.1. GENERALIDADES.

Una organización temporal es crucial para todos los organismos vivos, que llevan a cabo funciones diversas y recurrentes que deben realizarse en un momento adecuado y estar sincronizadas con las fluctuaciones del ambiente externo. Los ritmos biológicos desempeñan un papel clave en la organización temporal de la fisiología animal y poseen un importante significado adaptativo al sincronizar numerosas funciones del organismo con las variaciones del ambiente que lo rodea, permitiéndole de este modo anticiparse a los cambios predecibles de éste (Aschoff, 1981; Ali, 1992).



La mayoría de los autores distingue entre dos tipos de ritmos, los **ritmos exógenos** u oscilaciones debidas a un factor externo periódico, en ausencia del cual, es decir, en condiciones constantes, condiciones de curso libre o “free-running”, pierden su periodicidad. Y los **ritmos endógenos**, que persisten en condiciones medioambientales constantes, si bien el periodo del ritmo se puede desviar ligeramente, entrando en curso libre con su propia frecuencia natural. Es decir, la regularidad temporal de los ritmos endógenos requiere la presencia de marcapasos u osciladores (Aschoff, 1981).

Para que una oscilación ambiental pueda ser considerada como un verdadero “zeitgeber” o sincronizador debe cumplir los siguientes criterios (Moore-Ede y cols., 1982):

- a) Ausencia de otras señales temporales. El ritmo biológico debe seguir un curso libre con un determinado periodo antes de que se imponga al animal la señal temporal y debe recuperar su periodo una vez que la señal temporal ha sido eliminada.
- b) Control del periodo. El periodo del ritmo biológico debe coincidir con el del ciclo ambiental una vez que se expone al animal a dicho ciclo.
- c) Relación de fase estable. Tras pocos días de exposición al ciclo ambiental debe producirse una relación estable entre la fase del ritmo endógeno y la del factor ambiental que lo sincroniza.
- d) Control de fase. Cuando se elimina el sincronizador ambiental el ritmo biológico debe seguir un curso libre comenzando desde la fase determinada por la señal ambiental y no por la del ritmo anterior al encarrilamiento.

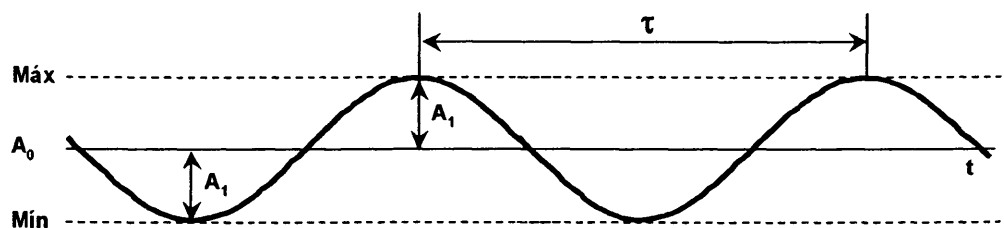
Numerosos factores ambientales modifican los ritmos biológicos no a través de una acción directa sobre el oscilador endógeno, sino mediante un efecto directo sobre la forma de la onda del ritmo. Este fenómeno se denomina “enmascaramiento” y se opone al “encarrilamiento” o sincronización del ritmo ejercido por los verdaderos “zeitgebers”. Sin embargo, desde una perspectiva práctica es muy difícil diferenciar ambos fenómenos, dado que muchos de los verdaderos “zeitgebers”, además de un efecto de sincronización, ejercen un efecto de enmascaramiento (Madrid y cols., 2001).

Una clasificación alternativa de los ritmos biológicos, basada en la duración de su periodo, incluye las siguientes categorías:

- a) Ritmos ultradianos, con un periodo menor de 20 horas. A esta clase pertenecen por ej., los ritmos mareales, que tienen una periodicidad cercana a 12,4 horas, y los ciclos cardiaco y respiratorio.
- b) Ritmos circadianos, con un periodo de entre 20 y 28 horas. Son los más extendidos entre los procesos fisiológicos y comportamentales.
- c) Ritmos infradianos, con un periodo mayor de 28 horas. Dentro de esta categoría se encuentran los ritmos lunares, con un periodo de unos 28 días, y los ritmos anuales, con un periodo aproximado de 365 días.

Los parámetros que definen un ritmo son (Esquema 1) (Chiquet y cols., 2001):

- a) Periodo ( $\tau$ ): Intervalo de tiempo que separa la aparición de eventos idénticos.
- b) Nivel medio o méso ( $A_0$ ): Media aritmética de todos los valores equidistantes de una variable a lo largo de un periodo.
- c) Amplitud ( $A_1$ ): Diferencia entre el máximo (o el mínimo) y el nivel medio.
- d) Máximo, pico: Valor máximo de la variable estudiada.
- e) Mínimo: Valor mínimo de la variable estudiada.
- f) Fase: Estado de una oscilación en un momento dado dentro del periodo.
- g) Acrofase: Punto temporal del ritmo donde tiene lugar el máximo.
- h) Batifase: Punto temporal del ritmo donde tiene lugar el mínimo.



**Esquema 1.** Parámetros que caracterizan un ritmo:  $A_0$ : nivel medio o méso;  $A_1$ : amplitud sinusoidal;  $\tau$ : periodo;  $t$ : tiempo; Máx: máximo; Mín: mínimo.

## 2.2. SISTEMA CIRCADIANO. OSCILADORES.

El sistema circadiano está compuesto por tres elementos básicos, una vía de entrada sensorial que permite sincronizar los ritmos endógenos con las oscilaciones cíclicas del ambiente, que en la mayoría de los sistemas circadianos se trata de información fótica; un órgano interno que genera las oscilaciones rítmicas endógenas, que es el oscilador, marcapasos o reloj, cuyas propiedades básicas y organización

funcional están muy conservadas en la evolución; y unas vías de salida o sistemas efectores que conducen la regulación temporal de los ritmos neuroendocrinos, fisiológicos y comportamentales.

Los relojes endógenos u osciladores se localizan en estructuras neuroanatómicas discretas dentro del sistema nervioso, estando estrechamente conectados con el sistema visual (Aschoff, 1981; Moore y Silver, 1998). Sin embargo, un sistema circadiano capaz de responder únicamente a señales luminosas sería demasiado rígido, y no permitiría a los organismos ajustarse a otros eventos ambientales importantes, como cambios en la disponibilidad de alimento, patrones de actividad de los predadores u oportunidades de apareamiento. Por tanto, un marcapasos circadiano que resulte máximamente beneficioso para los organismos debe ser capaz de responder a estímulos tanto fóticos como no fóticos (Prosser, 2000).

Los vertebrados tienen, al menos, dos osciladores circadianos, uno responsable de la sincronización a la luz (LEO, "light entrainable oscillator") y otro implicado en la sincronización a la alimentación periódica (FEO, "food entrainable oscillator"). En los mamíferos ambos osciladores son anatómica y funcionalmente independientes (Mistlberger, 1994), pudiendo estar mediados por mecanismos moleculares diferentes (Mistlberger y cols., 2001; Pitts y cols., 2003). Las lesiones del núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalámico producen arritmicidad, por lo que se admite que el LEO se localiza en dicho núcleo. Respecto al FEO, por el momento se desconoce su localización exacta y los factores que median su sincronización (Spieler, 1992). Según sugieren Stokkan y colaboradores (2001), este oscilador circadiano periférico podría estar localizado en el hígado, y estaría acoplado con el NSQ.

La generación y el mantenimiento de la ritmicidad circadiana en un oscilador se consigue gracias a complejas interacciones entre distintos genes reloj, que en la mayoría de los casos codifican para factores de transcripción que regulan su propia transcripción mediante mecanismos de retroalimentación negativos (*Period* –*Per*- 1, *Per* 2, *Per* 3, *Cryptochrome* –*Cry*- 1, *Cry* 2) o positivos (*Bmal* 1, *Clock*) (Sangoram y cols., 1998; Jin y cols., 1999; Kume y cols., 1999), estableciéndose de este modo lazos de transcripción/traducción que constituyen la base molecular de los relojes biológicos en los mamíferos (Young y Kay, 2001; Reppert y Weaver, 2001). El reloj circadiano del NSQ es capaz de integrar las variaciones en la longitud del día y, por tanto, codificar y decodificar la información estacional. En la interpretación de esta información estacional está implicada la regulación de los genes reloj (Messenger y cols., 1999; Nueßlein-Hildesheim y cols., 2000); de hecho, el fotoperiodo afecta de forma diferente al

patrón de expresión diario (duración del pico, fase, amplitud, nivel basal de expresión del ARNm) de los distintos genes reloj (Toumier y cols., 2003). En los peces hay pocos datos relativos a esta cuestión; mientras que en el pez cebra (*Danio rerio*) se ha demostrado la expresión rítmica del gen *Clock* en el techo óptico, el ojo y la glándula pineal (Whitmore y cols., 1998), en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) la expresión de dicho gen en el techo óptico y área pretectal no muestra un patrón rítmico diario (Mazurais y cols., 2000).

En cuanto a la localización de los osciladores en vertebrados no mamíferos, se han identificado osciladores circadianos en la glándula pineal, la retina y el hipotálamo, que actuarían conjuntamente para producir una ritmicidad circadiana estable (Weaver, 1999; Gwinner y Hau, 2000). En los peces se desconoce la localización exacta del marcapasos cerebral; por el momento no hay datos para pensar que el oscilador central deba estar localizado específicamente en la región supraquiasmática del encéfalo de los teleósteos, y no en, o junto con, el tálamo dorsal/área pretectal, donde convergen aferencias de la retina y la pineal y existe una alta densidad de sitios de unión a iodoMEL (Mazurais y cols., 1999; Gaildrat y cols., 2002).

Además de estos osciladores centrales, se ha demostrado la existencia de osciladores periféricos en distintos tejidos y células independientes (Plautz y cols., 1997; Whitmore y cols., 1998, 2000), siendo regulados directamente por la luz (Whitmore y cols., 2000). En el pez cebra se ha mostrado que la expresión de genes homólogos a *Clock* y *Bmal* oscila siguiendo un ritmo circadiano en casi todos los tejidos del pez, tanto *in vivo* como *in vitro* (Whitmore y cols., 2000). Por el momento se desconoce si estos relojes periféricos existen en mamíferos (aunque podrían existir células reloj independientes en la retina y en el nervio óptico), su posible función y si están coordinados y controlados por el reloj central. Algunas células de distintos órganos mantienen una actividad rítmica y expresan genes reloj con una periodicidad circadiana durante algunos días, pero esta propiedad desaparece en ausencia del NSQ (Yamazaki y cols., 2000). Buijs y colaboradores (2003) sugieren que el NSQ transmite su mensaje diario al resto del cuerpo por medio de ritmos hormonales y conexiones autónomas multisinápticas dentro de los diferentes órganos, y finalmente esta salida sincronizada desde el NSQ es la responsable de la expresión circadiana de proteínas reloj en los tejidos.

### 2.2.1. Complejo pineal y retina.

Tanto la retina como el complejo pineal intervienen en la generación y sincronización de la ritmicidad circadiana. El complejo pineal ha experimentado una notable transformación a lo largo de la filogenia, pasando de ser un órgano fotosensible



con pinealocitos fotorreceptores, que actúa como un fototransductor directo, generando una doble señal nerviosa y endocrina, en los peces y anfibios (Ekström y Meissl, 1997), por toda una gama de transición en reptiles y aves, hasta diferenciarse en la glándula pineal de los mamíferos, únicamente endocrina y sin capacidad fotorreceptora directa (Korf y cols., 1998). A pesar de estas marcadas diferencias filogénicas, la pineal sintetiza melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina, MEL) con un patrón nocturno rítmico en todos los vertebrados estudiados. La participación de la pineal en la generación y sincronización de ritmicidad circadiana en los peces es controvertida y probablemente dependiente de la especie, ya que tras la pinealectomía la ritmicidad se puede perder en ciertas especies (Kavaliers, 1979), y persiste en otras (Kavaliers, 1981; Sánchez-Vázquez y cols., 2000). En el carpín (*Carassius auratus*) (Kozuka y cols., 1989; Iigo y cols., 1991), lucio (*Exocoetis lucius*) (Falcón y cols., 1989; Coon y cols., 1998), *D. rerio* (Cahill, 1996) y pez gato (*Catostomus commersoni*) (Zachmann y cols., 1992a) el órgano pineal es capaz de mantener la síntesis rítmica de melatonina en condiciones de curso libre, lo que indica que las variaciones diarias de la síntesis de este indol podrían estar determinadas por osciladores circadianos intrapineales (Falcón y cols., 1992). Por el contrario, en la trucha arcoiris la síntesis rítmica de MEL desaparece en ausencia de señales externas (Gern y Greenhouse, 1988; Coon y cols., 1998). Todos estos datos ponen de manifiesto que la glándula pineal es un componente importante del sistema circadiano de los peces, aunque no parece ser un oscilador central.

La participación de la retina en la generación de ritmos circadianos no está del todo clara, y parece variar dependiendo de las especies (Tabata, 1992; Bayarri y cols., 2003). Por ejemplo, en la retina del pez sol verde (*Lepomis cyanellus*) se ha descrito un ritmo en la amplitud del electroretinograma generado por un oscilador intrarretiniano, mientras que el ritmo circadiano de movimientos retinomotores en los conos está determinado por un oscilador central (Deary y Barlow, 1987). La retina de los teleósteos, al igual que la pineal, envía aferencias nerviosas hacia distintos centros encefálicos (Ekström y Meissl, 1989), pero la posible influencia de la retina sobre el oscilador central en teleósteos aún no se ha demostrado, si bien, experimentos de enucleación o sección del nervio óptico afectan drásticamente a la expresión de distintos ritmos.

El hecho de que determinados ritmos diarios se mantengan en animales pinealectomizados o cegados bajo regímenes luz/oscuridad sugiere la existencia de otros fotorreceptores en el cerebro (Tabata y cols., 1988). Dichos fotorreceptores extrarretinianos y extrapineales se han descrito en regiones encefálicas de varios

vertebrados no mamíferos y podrían desempeñar un papel crítico en la organización temporal de peces, anfibios, reptiles y aves (Foster y cols., 1993a).

En resumen, actualmente se acepta que en el control circadiano de los seres vivos interviene más de un reloj biológico, tratándose de un sistema multioscillador (Underwood, 1990). La contribución relativa de los posibles distintos osciladores en el mantenimiento de la ritmicidad del organismo varía dependiendo de las especies (Underwood y cols., 2001). Normalmente, los múltiples ritmos circadianos de un animal muestran relaciones de fase fijas, por lo que estos ritmos han de estar acoplados, aunque esta hipotética comunicación entre ellos hoy día es aún muy desconocida. Estudios recientes en peces apoyan la existencia de un acoplamiento parcial entre el LEO y el FEO (Aranda y cols., 2001).

### 2.3. RITMOS EN HEMATOLOGÍA.

El riñón es el órgano hematopoyético más importante en los peces, existiendo dos sitios principales de hematopoyesis, el riñón anterior, cefálico o pronefrico, y el tronco del riñón o riñón opistonefrico. El pronefros se considera análogo a la médula ósea de los mamíferos, y es el principal órgano hematopoyético de los peces y el principal sitio de diferenciación de eritrocitos, granulocitos, linfocitos B y monocitos, además de ser el principal órgano productor de anticuerpos (Rowley y cols., 1988; Ellis, 1989; Zapata y cols., 1992). Aunque el bazo participa también en la hematopoyesis, en la mayoría de los peces su papel en este proceso se considera secundario al del pronefros, a pesar de que en algunas especies, como la perca (*Perca fluviatilis*), es el único órgano hematopoyético (Rowley y cols., 1988).

La sangre de los peces contiene eritrocitos nucleados, trombocitos, linfocitos, granulocitos y monocitos. En la inmensa mayoría de los peces los eritrocitos son el tipo celular dominante de la sangre (Fotografía 3). El tamaño y la forma de los eritrocitos es también variable, siendo en general, de menor tamaño en los teleósteos que en los agnados, condrictios y dipnoos, y el núcleo rara vez presenta nucleolo. Los valores de hematocrito y hemoglobina son muy variables tanto en una determinada especie como entre especies distintas, diferencias que parecen correlacionarse con numerosos factores. Por ejemplo, el estilo de vida del pez parece determinar su hematocrito. Así, los nadadores rápidos y activos suelen tener valores elevados de hematocrito y hemoglobina, mientras que los nadadores lentos presentan valores bajos para ambos parámetros (Rowley y cols., 1988). Además, se han descrito en varias especies de peces cambios estacionales en el número de glóbulos rojos (Audet y cols., 1993; Martínez y

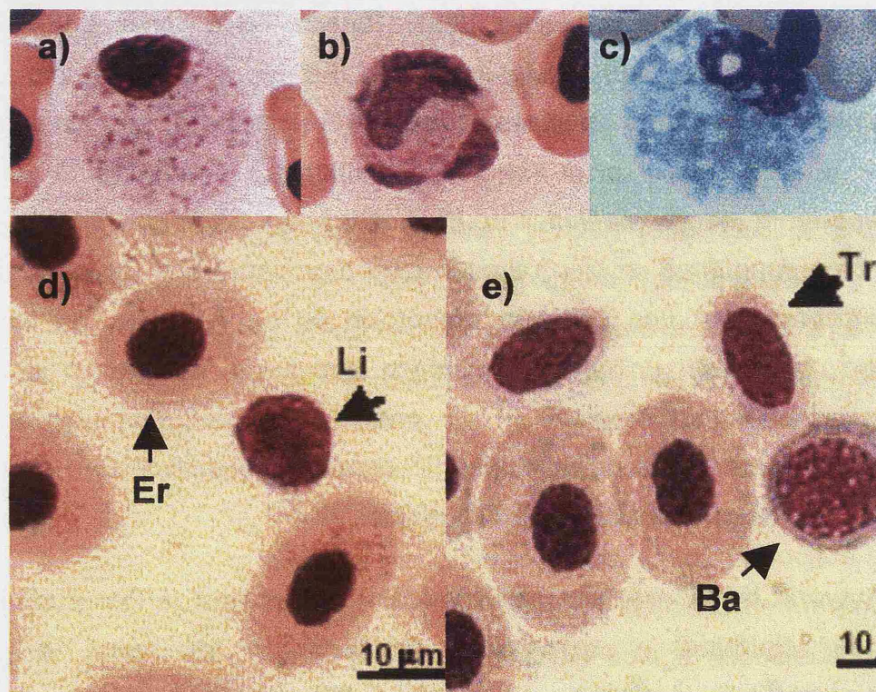
cols., 1994; Collazos y cols., 1998; Frangioni y cols., 1997; Luskova, 1997; Kavadias y cols., 2004), que parecen estar relacionadas tanto con los cambios anuales en la fisiología del pez como con alteraciones en las condiciones ambientales naturales de su hábitat. En esta regulación del número de glóbulos rojos circulantes interviene principalmente el bazo, capaz de almacenar una gran cantidad de células y liberarlas a la circulación cuando las demandas así lo requieren (Pearson y cols., 1992), si bien en el ciprínido *Phreatichthys andruzzii* el hígado es mayoritariamente el órgano encargado de este mecanismo de compensación respiratoria (Frangioni y cols., 1997).

El sistema defensivo en los teleósteos está compuesto de subpoblaciones de leucocitos que incluyen los linfocitos B y T, los granulocitos, los trombocitos, los monocitos-macrófagos y las células citotóxicas inespecíficas (Press y Evensen, 1999; Olabuenaga, 2000). El número de leucocitos en sangre es muy variable dependiendo de la especie y la condición fisiológica. En la sangre de los peces, los linfocitos son el tipo de leucocito más abundante, representando hasta un 85% de la población total de leucocitos (Olabuenaga, 2000; Nordgarden y cols., 2003; Ranzani-Paiva y cols., 2003; Valenzuela y cols., 2003). Los linfocitos son células pequeñas, 5-8  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una relación núcleo:citoplasma elevada y citoplasma basófilo (Fotografía 3), producidas en su gran mayoría en el pronefros y en el timo. Los trombocitos (Fotografía 3) se encuentran generalmente en la sangre periférica de los peces y su función principal es participar en la coagulación sanguínea, si bien parecen tener una capacidad fagocítica limitada. Los monocitos representan una pequeña proporción de los leucocitos de los peces. Se caracterizan por poseer un núcleo excéntrico, con forma de riñón o bilobulado y un citoplasma agranulado (Fotografía 3). La presencia de heterofagosomas y vesículas pinocíticas periféricas pone de manifiesto la capacidad fagocítica de estas células que participan en las respuestas inflamatorias agudas.

La mayoría de los estudios morfológicos y funcionales de los granulocitos se ha realizado en ciprínidos y salmónidos, diferenciando tres tipos de granulocitos: heterófilos/neutrófilos, eosinófilos y basófilos (Fotografía 3), pero no siempre se encuentran los tres tipos celulares en la misma especie. Los heterófilos/neutrófilos son los granulocitos más abundantes, tienen un diámetro de 10  $\mu\text{m}$ , con un núcleo excéntrico y parcialmente lobulado y un gran citoplasma en el que se distinguen gránulos electrodensos de forma redonda y ovalada de distinto tamaño. Entre sus principales funciones está la fagocitosis y la actividad microbicida (Pedrera y cols., 1993). Los eosinófilos son pequeñas células de 7,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un núcleo excéntrico con forma alargada o bilobulado y los gránulos, eosinófilos, son más grandes que los de los

neutrófilos. Aunque su morfología coincide con la de eosinófilos de los mamíferos, no se ha podido demostrar su analogía funcional. En los peces se han encontrado células eosinófilas distribuidas por el tejido conjuntivo del tracto gastrointestinal y de las branquias, cuya función no está clara, pero que podrían intervenir en procesos inflamatorios y de defensa celular (por lo que se han comparado con los mastocitos de mamíferos) (Lamas y cols., 1994). Finalmente, los basófilos tienen un diámetro de 10-20  $\mu\text{m}$  y grandes gránulos basófilos.

Los monocitos/macrófagos son grandes leucocitos con un gran núcleo de forma ovalada/arriñonada. Su presencia en la sangre de ciertos órdenes de peces es muy escasa pero aumenta tras una infección. Son, junto a los granulocitos, las principales células fagocíticas en los peces. Los granulocitos, junto con los fagocitos mononucleares o macrófagos tisulares, pertenecen a las células fagocíticas que desempeñan un importante papel en los mecanismos de defensa de los vertebrados.



**Fotografía 3.** Tipos celulares presentes en la sangre de los peces. a) eosinófilo, b) neutrófilo, c) monocito, d) linfocito (Li) y eritrocitos (Er); e) trombocitos (Tr) y basófilo (Ba).

Los peces teleósteos, a diferencia de los mamíferos, carecen de médula ósea y nódulos linfáticos (Press y Evensen, 1999), por lo que en ellos los principales órganos linfopoyético son el timo, el riñón, el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas (Press y Evensen, 1999; Olabuenaga, 2000).

Los cambios estacionales en los leucocitos en los peces han sido estudiados en varias especies de teleósteos (Zapata y cols., 1992; Collazos y cols., 1995b; Luskova, 1997; Nordgarden y cols., 2003; Kavadias y cols., 2004), mostrando alteraciones anuales en los porcentajes relativos de los distintos tipos de glóbulos blancos y en la capacidad fagocítica de la sangre. En general, en los poiquiloterms existe una respuesta inmune pobre durante el período invernal en comparación con el verano, aun cuando la temperatura permanezca constante (Olabuenaga, 2000). En la tenca existe bastante información en este sentido, habiéndose descrito de forma exhaustiva las variaciones estacionales de su sistema inmune y el efecto de la temperatura sobre la función fagocítica (Collazos y cols., 1994a,b,c, 1995a,b,c, 1996).

## **2.4. RITMICIDAD DE LAS RESERVAS METABÓLICAS.**

Desde el punto de vista de almacén de energía, los lípidos constituyen la principal fuente energética, si bien en el estudio del crecimiento de los peces se ha prestado mucha atención a la síntesis de proteínas y se ha dado menos importancia a la síntesis de lípidos, y mucha menos aún a la síntesis de carbohidratos, debido a la baja utilización de éstos y a su escasa contribución, en términos energéticos, en comparación con los otros dos tipos de macronutrientes.

Por lípidos entendemos un conjunto heterogéneo de compuestos orgánicos insolubles en agua y fácilmente solubles en solventes orgánicos. Dentro de esta gran categoría de compuestos, los lípidos neutros, acilgliceroles principalmente, son los implicados en el almacén de energía. El metabolismo lipídico se ha estudiado en profundidad en los peces, especialmente en especies de cultivo, como los salmónidos (Bell, 1998); sin embargo se ha estudiado mucho menos los aspectos relativos al almacenamiento lipídico. Los teleósteos poseen varios sitios de almacenamiento de lípidos, siendo los principales el hígado y el músculo rojo. Además, existen depósitos de lípidos, que contienen principalmente triglicéridos, localizados subcutánea y perivisceralmente y en la cavidad abdominal, a menudo asociados con el intestino; en especies marinas, el esqueleto puede almacenar grandes cantidades de triglicéridos (Phleger y cols., 1995). Los triglicéridos sintetizados en el hígado deben ser exportados hacia otros lugares de almacenamiento circulando por el torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas de muy baja densidad. Los depósitos de lípidos se movilizan por acción de una triacilglicerol lipasa sensible a hormonas, como la insulina, el glucagón y la adrenalina.



La síntesis proteica es un proceso que consume una parte importante de toda la energía utilizada por los peces, estando claramente correlacionada con la alimentación. Así, el recambio proteico contribuye de forma prioritaria al metabolismo energético en los peces, de forma que cuando la cantidad de aminoácidos libres en plasma o en tejidos es insuficiente se produce la degradación de proteínas endógenas para cubrir las necesidades energéticas (Cho y Kaushik, 1990).

Los carbohidratos desempeñan tanto funciones estructurales como de almacén de energía, siendo el glucógeno la principal forma de almacenamiento en los vertebrados. Además del músculo, almacén principal donde el glucógeno se acumula como reserva de uso limitado a corto plazo, otros tejidos como el hígado y el cerebro almacenan carbohidratos, si bien constituyen sólo una pequeña proporción de la masa total del pez. Aún en los casos más extremos, como por ejemplo en *Carassius carassius* en invierno, donde se ha encontrado la concentración de glucógeno más elevada de los vertebrados (aproximadamente el 20% del peso del hígado), esta reserva representa una contribución mínima al contenido calórico del pez (Mommsen, 1998; Hemre y cols., 2002).

La mayoría de los peces experimenta cada año un severo agotamiento de sus reservas energéticas. Así, se han propuesto variaciones estacionales en las reservas metabólicas en varias especies de peces. Por ejemplo, el contenido de proteínas en el músculo de la trucha común (*Salmo trutta*) experimenta variaciones estacionales (Arévalo y Durán, 1988) paralelas a las variaciones en el contenido de lípidos, aunque cuantitativamente menos acusadas, con los valores mínimos en enero y los máximos en agosto. Berg y Bremset (1998) encontraron una reducción en el contenido de proteínas (en el pez completo) en el salmón atlántico y en la trucha común durante el invierno. Nordgarden y colaboradores (2003) describen en *S. salar* una influencia importante del fotoperiodo en las variaciones estacionales del contenido muscular de proteínas. Sin embargo, en el bacalao común (*Gadus morhua*) los cambios estacionales en el contenido muscular de proteínas parecen estar relacionados con la variación estacional de la disponibilidad de alimento (Foster y cols., 1993b).

En relación con las variaciones estacionales de los lípidos, en los peces la mayoría de los estudios realizados se refieren a cambios en lípidos circulantes, como el colesterol (Babin y Vernier, 1989; Bon y cols., 1997) o lipoproteínas (Wallaert y Babin, 1994) y su correlación con ciclos reproductores y/o estado nutricional. Existe un número reducido de estudios que analicen los cambios estacionales en las reservas lipídicas en órganos concretos. En este sentido, recientemente se ha sugerido que la variación estacional del

contenido muscular de lípidos en *S. salar* en condiciones naturales, que muestra una reducción de enero a marzo y un aumento continuo durante verano y otoño, depende esencialmente del fotoperiodo (Nordgarden y cols., 2003). En la trucha arcoiris se ha observado una variación anual en las concentraciones de lipoproteínas de baja densidad, de forma que factores ambientales como el fotoperiodo, o neuroendocrinos como la concentración de esteroides sexuales, pueden estar implicados en la regulación de estas variaciones, sin descartar la posible existencia de un reloj endógeno sincronizado por el fotoperiodo (Wallaert y Babin, 1994). El ritmo anual de lípidos también puede venir determinado por un ritmo estacional de crecimiento y apetito, como se ha descrito para la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) (Jobling y cols., 1998).

Además, en varias especies de peces se han descrito variaciones diarias en los niveles circulantes de distintos metabolitos, enzimas (Sánchez-Muros y cols., 2001) y hormonas relacionadas con el metabolismo (Boujard y Leatherland, 1992a; Boujard y cols., 1993; Cerdá-Reverter y cols., 1996; Pavlidis y cols., 1997; 1999a,b; Gilchrist y cols., 1998), estando sincronizadas algunas de estas oscilaciones diarias con la hora de la alimentación, otras con la alternancia luz/oscuridad, e incluso en algunos casos con el patrón de actividad general de la especie.

## 2.5. RITMOS DE ACTIVIDAD.

En los mamíferos, el ciclo sueño-vigilia muestra una ritmicidad diaria con un importante valor adaptativo. En los peces, no podemos hablar de sueño *sensu stricto*, sino de patrones actividad-descanso. Las fases de descanso en los peces pueden reconocerse aplicando varios criterios comportamentales, como por ejemplo la inactividad prolongada en una postura de descanso típica, el uso de estructuras protectoras y umbrales de excitación elevados. Por lo tanto, la mayoría de los autores considera que un pez está en fase de reposo cuando permanece completamente inmóvil, en un lugar protegido y con una sensibilidad muy baja a distintos estímulos. Además de estos criterios comportamentales se utilizan criterios fisiológicos, como la frecuencia respiratoria y cardíaca y los movimientos oculares.

En función de los ritmos de actividad, los vertebrados pueden clasificarse, de forma general, en diurnos, nocturnos y crepusculares. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en aves y mamíferos, en los peces estos patrones no siempre son constantes en una especie e incluso en un mismo individuo. En un número elevado de especies algunos individuos son diurnos mientras que otros son nocturnos, a veces incluso un mismo individuo puede cambiar su comportamiento de diurno a nocturno en sólo unos pocos

días. Por esta razón se admite que los peces muestran una extraordinaria plasticidad. En ciertas especies dichos ritmos son endógenos, y están sincronizados por la alternancia día/noche, mientras que en otras son sincronizados por señales ambientales que oscilan diariamente, siendo la luz el factor más importante.

La tenca es una especie estrictamente nocturna (Herrero y cols., 2003). Registros pioneros realizados por Peyrethon y Dusan-Peyrethon (1967) mostraron que durante el día permanece en el fondo del tanque durante periodos de 15-20 minutos sin realizar movimientos y con la tasa respiratoria reducida al 65% del valor nocturno. No reacciona a la aproximación de un objeto hasta que éste contacta con el pez, mostrando periodos de actividad sólo durante el 20% de la fase diurna, mientras que es activa durante el 60% del periodo nocturno. Si las luces se encienden durante la noche la actividad nocturna disminuye al 26%. En un estudio reciente se ha demostrado que esta actividad nocturna estricta se detiene al iluminar los peces en mitad de la noche, volviendo a recuperar la actividad locomotora al imponer de nuevo condiciones de oscuridad (Vera y cols., 2004a). Además, en este mismo estudio, se ha observado que bajo un fotoperiodo largo extremo (22L:2D) la actividad de la tenca se restringe a las horas de oscuridad, y el comportamiento estrictamente nocturno persiste incluso bajo condiciones de luz de muy baja intensidad (0,3 lux) (Herrero y cols., 2003).

### 2.6. RITMOS DE ALIMENTACIÓN.

Los peces, al igual que la mayoría de los organismos no se alimentan de forma constante a lo largo de las 24 h, sino que presentan un patrón de alimentación diario. La ritmicidad de la alimentación puede ser de horas (periodicidad prandial), días e incluso estacional. Sin embargo, en los peces, la mayoría de los estudios realizados ha investigado ritmos de alimentación circadiana, habiendo dedicado poca atención a otros posibles ritmos. Tanto en condiciones naturales como en cautividad, se han clasificado los patrones de alimentación de los peces en tres categorías: nocturnos, diurnos y crepusculares, si bien es difícil clasificar a las especies como estrictamente diurnas o estrictamente nocturnas (Boujard, 1999). En la mayoría de las especies este patrón está determinado genéticamente, y en algunos casos puede estar también condicionado por requerimientos sensoriales especiales, como la dependencia de la visión o el olfato para la captura del alimento (Dou y Tsukamoto, 2003).

Algunas especies muestran ritmos de alimentación duales, es decir, cambian de forma más o menos rápida de un patrón diurno a uno nocturno y viceversa, dualidad que puede ser espontánea o inducida por cambios ambientales (Madrid y cols., 2001). En la



lubina (*Dicentrarchus labrax*) se han observado simultáneamente patrones de alimentación nocturnos y diurnos en grupos mantenidos en las mismas condiciones. Además, algunos individuos muestran una inversión completa y espontánea de su patrón de actividad alimentaria en tan sólo unos días (Sánchez-Vázquez y cols., 1995a,b). La temperatura también puede modificar el patrón de alimentación, así, el salmón atlántico, que muestra un patrón de alimentación diurno (Kadri y cols., 1997) pasa a ser nocturno a bajas temperaturas (Fraser y Metcalfe, 1997).

Se ha demostrado la existencia de un origen endógeno de los ritmos de alimentación en las siguientes especies: *S. salar*, *S. alpinus*, *O. mykiss*, *D. labrax* y *C. auratus*, en las que el ritmo de alimentación diario se conserva en condiciones constantes de iluminación (LL o DD) o bajo ciclos ultradianos (Madrid y cols., 2001).

En muchas especies de peces se producen cambios estacionales en la alimentación relacionados con las variaciones del fotoperiodo (Villarreal y cols., 1988; Heggenes y cols., 1993; Saether y cols., 1996; Tveinten y cols., 1996). En general, la ingesta es mayor en primavera, coincidiendo con el incremento del fotoperiodo, y disminuye en otoño, cuando el fotoperiodo se acorta (Higgings y Talbot, 1985). De hecho, se ha demostrado que la luz es un potente sincronizador del ritmo de alimentación en varias especies de teleósteos (Sánchez-Vázquez y cols., 1995a, 1996; Sánchez-Vázquez y Tabata, 1998).

En condiciones naturales, los cambios de fase de los ritmos de alimentación podrían también estar relacionados con las variaciones estacionales de la disponibilidad relativa de las diferentes presas. Así, la lubina, que puede alimentarse de una amplia variedad de presas, y cuya composición dietaria varía estacionalmente (Picket y Pawson, 1994), puede invertir su ritmo de alimentación dependiendo del momento del año.

Se han descrito ritmos mareales de alimentación asociados a los movimientos verticales y horizontales de las presas que utilizan las corrientes mareales para migrar o sincronizar sus ritmos reproductores (Madrid y cols., 2001).

La importancia de la disponibilidad periódica de alimento en el control de los ritmos de alimentación en los peces ha sido estudiada con profundidad (Sánchez-Vázquez y cols., 1995b, 1997; Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001). Cuando se restringe el momento de la alimentación a determinadas horas del día, éste adquiere relevancia como principal sincronizador de los ritmos biológicos provocando modificaciones en los ritmos conductuales y fisiológicos, que desplazan sus acrofases a los momentos próximos a las horas de alimentación, fenómeno denominado actividad anticipatoria al alimento y que se

produce tanto en condiciones LD como LL o DD (Mistlberger, 1994). En algunos casos, aparece una curva bimodal, con un componente asociado al ciclo luz/oscuridad y otro asociado a las horas de alimentación, sugiriendo la existencia de dos relojes desacoplados (Escobar y cols., 2001). Esta dualidad interna apoya la hipótesis de que el sistema circadiano de los peces está compuesto por varios osciladores. Algunos de los ritmos circadianos estarían sincronizados por los ciclos L/D, mientras que otros utilizarían la alimentación periódica como principal sincronizador (Spieler, 1992), y estarían gobernados por el LEO y el FEO, respectivamente.

### 3. RITMICIDAD DE REGULADORES DE LA INGESTA.

Los mecanismos implicados en la regulación de la homeostasis energética y el comportamiento alimentario son multifactoriales y, a pesar de haber sido extensamente estudiados en los mamíferos, hasta el momento no están completamente definidos. El sistema de neuronas, neuropéptidos, neurotransmisores y receptores que controlan el balance energético es sumamente complejo (Berthoud, 2002). Dentro de este sistema, el hipotálamo ocupa un papel central integrando señales periféricas y señales procedentes de otros centros del sistema nervioso central (SNC) y emitiendo, a su vez, mensajes que regulan el equilibrio energético (De Pedro y Björnsson, 2001; Sahu, 2004a). No obstante, el tallo encefálico y otras áreas cerebrales también parecen tener una gran relevancia en la regulación de la homeostasis energética (Grill y Kaplan, 2002). La mayoría de los trabajos dirigidos al estudio de los sistemas implicados en el control de la homeostasis energética y las relaciones que se establecen entre ellos se ha realizado en los mamíferos, particularmente en roedores, y apenas existe información en otros grupos de vertebrados. A continuación, exponemos algunos datos en relación con los reguladores que se han estudiado en la presente Memoria.

#### 3.1. GHRELINA.

##### 3.1.1. Estructura.

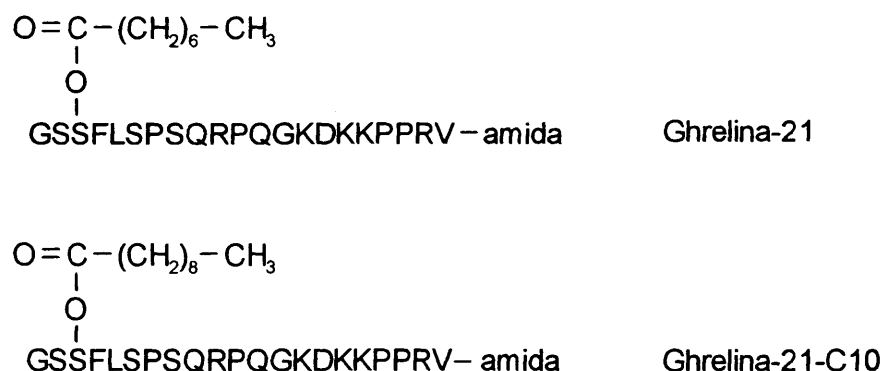
La ghrelina es un péptido de 28 aminoácidos (aa) obtenido a partir de extractos de estómago de rata mediante el empleo de células que expresan el receptor para el secretagogo de la hormona del crecimiento (GHS-R) (Kojima y cols., 1999). El número de aa de este péptido depende de la especie (Esquema 2), variando desde los 28 aa de la ghrelina de mamíferos (Kojima y cols., 1999) y rana toro (*Rana catesbiana*) (Kaiya y cols., 2001) hasta los 19 aa del carpín (Unniappan y cols., 2002). En todas las especies estudiadas hasta la actualidad la molécula de ghrelina presenta una característica estructural única, la acilación con una molécula de ácido *n*-octanoico o *n*-decanoico del

tercer residuo, serina (Ser<sup>3</sup>) en aves (Kaiya y cols., 2002), mamíferos (Kojima y cols., 1999), y peces (Unniappan y cols., 2002; Kaiya y cols., 2003a, b), y treonina (Thr<sup>3</sup>) en anfibios (Kaiya y cols., 2001). Esta acilación es esencial tanto para la unión al receptor (Muccioli y cols., 2001) como para desarrollar la actividad biológica (Kojima y cols., 1999), y permite a la ghrelina atravesar la barrera hematoencefálica (Banks y cols., 2002). No obstante, se encuentran niveles circulantes elevados de ghrelina no acilada que parecen ser los responsables de ciertos efectos cardiovasculares y antiproliferativos, probablemente mediados por algún subtipo de GHS-R aún no identificado o por otra familia de receptores distinta (Cassoni y cols., 2001). Los aminoácidos de las posiciones 1, 4, 5, 6 y 7 se conservan en todas las especies estudiadas, no así la secuencia que sigue a estos 7 primeros aminoácidos, que varía sustancialmente en las diferentes especies (Kaiya y cols., 2001) (Esquema 2). Se cree que el “núcleo” activo mínimo de la ghrelina está constituido por el tetrapéptido GSSF del extremo N-terminal (Matsumoto y cols., 2001), que contiene el grupo octanoilo. No se conoce el papel del extremo C-terminal, aunque se ha sugerido que éste, junto con la acilación del tercer residuo de la secuencia de aminoácidos, podría intervenir en el establecimiento de la conformación bioactiva de la molécula madura de ghrelina (Bowers, 2001).

Tilapia	G	S	S	F	L	S	P	S	-	Q	K	P	Q	N	K	-	-	V	K	-	S	S	R	I	-	-	-	-
Anguila	G	S	S	F	L	S	P	S	-	Q	R	P	Q	G	K	-	D	-	K	K	P	P	R	V	-	-	-	-
Carpín dorado	G	T	S	F	L	S	P	A	-	Q	K	P	Q	G	R	R	-	-	-	-	P	P	R	M	-	-	-	-
Rana toro	G	L	T	F	L	S	P	A	D	M	Q	K	I	A	E	R	Q	S	Q	N	K	L	R	H	G	N	M	N
Pollo	G	S	S	F	L	S	P	T	Y	K	N	I	Q	Q	Q	K	D	T	R	K	P	T	A	R	-	-	L	H
Rata	G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	A	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R
Humano	G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	R	V	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R

**Esquema 2.** Comparación entre las secuencias de aminoácidos de las ghrelinas maduras de distintas especies. Los aminoácidos recuadrados son idénticos en todas las especies.

En *Anguilla japonica* se han purificado dos formas moleculares de ghrelina, constituidas ambas por 21 aminoácidos de secuencia idéntica y una estructura amida en el extremo C-terminal (Kaiya y cols., 2003a) (Esquema 3). Ambas formas se diferencian en el tipo de ácido que modifica por acilación el tercer residuo (Ser<sup>3</sup>). En una de ellas, la ghrelina-21, este ácido tiene 8 átomos de carbono (ácido *n*-octanoico), mientras que la otra forma está modificada por ácido *n*-decanoico. Los siete primeros aminoácidos de la ghrelina de la anguila muestran una homología del 100% con los de las ghrelinas de mamíferos.



**Esquema 3.** Secuencia de aminoácidos de las dos formas de ghrelina identificadas a partir de extractos de estómago de *Anguilla japonica* mostrando la modificación por acilación del residuo serina en posición 3 por la unión de una molécula de ácido octanoico (ghrelina-21) o decanoico (ghrelina-21-C10) al grupo hidroxilo de este aminoácido.

Kaiya y colaboradores (2003b) han identificado recientemente la ghrelina de tilapia (*Oreochromis mossambicus*) y han clonado el cDNA que codifica para la proteína precursora del péptido activo. Estos autores identificaron dos formas de ghrelina en esta especie. En ambas, al igual que en mamíferos, pollo y anguila, el tercer residuo es una serina. La forma minoritaria, cuya estructura completa no se ha podido confirmar hasta el momento, presenta una modificación de la Ser<sup>3</sup> por ácido *n*-dodecanoico, mientras que la forma predominante (ghrelina-C10), con 20 aa, está modificada por ácido *n*-decanoico. El extremo C-terminal del péptido posee una estructura amida, que también se ha encontrado en el carpín dorado (Unniappan y cols., 2002) y la anguila japonesa (Kaiya y cols., 2003a), pero no en las ghrelinas de mamíferos, aves y anfibios (Kojima y cols., 1999; Kaiya y cols., 2001, 2002), lo que sugiere que esta estructura amida del extremo C-terminal podría ser una característica que se ha conservado en los peces, pero no parece afectar a la unión al receptor ni a la actividad biológica del péptido (Kaiya y cols., 2003a). El péptido maduro muestra una identidad del 67% respecto a la ghrelina de la anguila (Kaiya y cols., 2003a) y del 55% respecto a la del carpín dorado (Unniappan y cols., 2002).

La vida media de la ghrelina en la circulación es de 5-15 minutos, y en su degradación parecen estar implicados principalmente procesos enzimáticos. El único factor conocido hasta el momento capaz de desactivar a la ghrelina son las lipoproteínas de alta densidad (HDL), que pueden unirse a ella y desacilarla, eliminando así la capacidad de la ghrelina para unirse a sus receptores (Beaumont y cols., 2003).

### 3.1.2. Distribución.

En todas las especies estudiadas la expresión más alta del ARNm de la ghrelina se encuentra en el estómago (Muccioli y cols., 2002). En mamíferos la ghrelina se produce principalmente en células endocrinas, denominadas Gr, de las glándulas oxínticas del fundus del estómago, cuya localización próxima a la red de capilares de la *lamina propria* del estómago facilita su función endocrina (Muccioli y cols., 2002). La ghrelina también se sintetiza, aunque en menores cantidades, en intestino, testículo, hipófisis, hipotálamo, páncreas y otros tejidos (Gnanapavan y cols., 2002; Muccioli y cols., 2002). La expresión génica de ghrelina en peces se ha estudiado en un número muy reducido de especies. En la anguila japonesa, la expresión más elevada se ha hallado en el estómago, encontrándose niveles bajos en el intestino, y aún más bajos en cerebro, corazón y riñón, no detectándose en branquias (Kaiya y cols., 2003a). Estos mismos autores detectan en tilapia niveles de expresión génica elevados en el estómago y reducidos en cerebro y órganos implicados en la osmorregulación, como son riñón y branquias (Kaiya y cols., 2003b). Sin embargo, en esta misma especie, Parhar y colaboradores (2003) únicamente encuentran ghrelina en estómago pero no en otros órganos (cerebro, hipófisis, corazón, riñón y gónadas). Finalmente, en el carpín la distribución parece ser amplia (cerebro, intestino, hipófisis, hígado, bazo, branquias) (Unniapan y cols., 2002) y muestra cambios en relación con la actividad alimentaria (Unniapan y cols., 2004).

### 3.1.3. Receptores de los secretagogos de la GH (GHS-R) y mecanismos de acción.

El GHS-R es un miembro de la familia de los receptores acoplados a proteínas G, y el gen que lo codifica está muy conservado a lo largo de la filogenia (Howard y cols., 1996). Existen dos tipos de receptores: el GHS-R tipo 1a, funcional, formado por 366 aa, con siete dominios transmembrana, tres lazos extracelulares y tres lazos intracelulares; y el 1b, no funcional, de 289 aa, con cinco dominios transmembrana, dos lazos extracelulares y 2 lazos intracelulares (Howard y cols., 1996). En el teleosteo *Fugu rubripens* se han aislado 3 clones de distinta longitud que revelan la existencia del sistema GSH-R con una elevada conservación de los dominios de activación por el ligando (Palyha y cols., 2000).

El GHS-R tipo 1a se expresa principalmente en la hipófisis y en niveles muy inferiores en tiroides, páncreas, bazo, miocardio y glándula adrenal (Gnanapavan y cols., 2002). El tipo 1b muestra una distribución más amplia, expresándose en una gran variedad de tejidos, como el tracto gastrointestinal, el hígado, el pulmón, el músculo y el testículo (Howard y cols., 1996). Finalmente, estos receptores están presentes también en el hipotálamo, colocalizados con neuronas productoras de neuropéptidos y

neurotransmisores implicados en el control del apetito, como la proteína relacionada con agouti (Ag-RP), la proopiomelanocortina (POMC) y el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) (Cowley y cols., 2003), y en los somatotropos de la hipófisis anterior (Guan y cols., 1997), así como en otras áreas encefálicas no relacionadas con la secreción de GH, como el giro dentado del hipocampo, la sustancia nigra, el área tegmental ventral y la región dorsal y medial del núcleo del rafe (Guan y cols., 1997), sugiriendo para la ghrelina una gran variedad de posibles funciones.

La unión de la ghrelina, o cualquiera de los GHSs al GHS-R, no incrementa los niveles intracelulares de AMPc, pero amplifica el incremento de la producción de AMPc inducido por la GHRH (Smith y cols., 1996), potenciando la secreción de GH. La activación del GHS-R produce un aumento del contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y activa la vía del inositol trifosfato (IP3) y la proteína kinasa C (PKC) (Howard y cols., 1996; Ghigo y cols., 2001).

### **3.1.4. Actividades biológicas. Regulación de la ingesta y el estado nutricional.**

La primera función descrita para la ghrelina fue la regulación de la secreción de GH (Kojima y cols., 1999). Sin embargo, numerosos estudios han puesto de manifiesto la participación de la ghrelina en la homeostasis energética (Tschöp y cols., 2000; Horvath y cols., 2003) y en la regulación de la ingesta (Asakawa y cols., 2001; Broglio y cols., 2003; Horvath y cols., 2003), siendo considerada actualmente como el segundo agente orexigénico más potente conocido después del NPY (Kalra y cols., 2003). Dicha acción orexigénica es independiente de la estimulación de la secreción de GH, estando probablemente mediada por la activación de neuronas del núcleo arqueado (ARC) (Guan y cols., 1997; Kamegai y cols., 2001) que expresan péptidos orexigénicos, como el NPY o la Ag-RP (Cowley y cols., 2003; Toshinai y cols., 2003). El efecto de la administración central de ghrelina sobre el peso corporal y la ingesta en los mamíferos es muy superior (más de 1.000 veces) al de la administración periférica, lo que apoya la hipótesis de que la ghrelina regula la homeostasis energética principalmente a través de mecanismos centrales (Wren y cols., 2001). Algunos autores sugieren que la ghrelina podría estar implicada en la iniciación de la ingesta, dado que su administración en humanos produce sensación de hambre (Cummings y cols., 2001; Horvath y cols., 2001). De modo que la ghrelina es la única señal periférica conocida en la actualidad capaz de equilibrar distintos factores de saciedad gastrointestinales, pancreáticos y adipocíticos a través de sus efectos estimuladores del apetito (Marx, 2003). En definitiva, podría ser un reflejo agudo del estado del balance nutricional, indicando al SNC, en momentos de privación de alimento, cuándo es necesario el incremento en la ingesta y el mantenimiento de un

estado metabólico que garantice el ahorro energético (Horvath y cols., 2001). Todos estos datos inducen a pensar en la ghrelina como vínculo endocrino entre el estómago, el hipotálamo y la hipófisis.

Además de estas acciones, se ha implicado a la ghrelina en el control de otras funciones, como la secreción de PRL, la estimulación de la secreción de ácido y la motilidad gástrica, funciones cardiovasculares, procesos de ansiedad y memoria, crecimiento de células neoplásicas y la regulación del sueño (Muccioli y cols., 2002; Broglio y cols., 2003).

Se sabe muy poco acerca de los efectos de la ghrelina en vertebrados no mamíferos. La ghrelina muestra un potente efecto activador de la secreción de GH y PRL en anguila (Kaiya y cols., 2003a) y en tilapia (Riley y cols., 2002, Kaiya y cols., 2003b). Las inyecciones ICV e IP de ghrelina estimulan la ingestión de alimento en *C. auratus* (Unniappan y cols., 2002; 2004). Sin embargo, no está claro si el efecto primario de la ghrelina sintetizada en el estómago de los peces es estimular la secreción de GH por la hipófisis o estimular el comportamiento alimentario directa o indirectamente a través de factores orexigénicos hipotalámicos.

### 3.1.5. Ritmos anuales y diarios.

En la actualidad hay muy pocos estudios que analicen los posibles cambios estacionales en los niveles de ghrelina circulantes. Estudios realizados en mamíferos han puesto de manifiesto cambios en los niveles plasmáticos de esta hormona a lo largo del año, siendo elevados en otoño y bajos en invierno en el perro mapache (*Nyctereutes procyonides*) (Nieminen y cols., 2002). También en el zorro ártico (*Alopex lagopus*) se han descrito fluctuaciones en la ghrelina plasmática, con niveles más altos en mayo que en noviembre (Fuglei y cols., 2004). En peces, concretamente en *Lota lota*, Mustonen y colaboradores (2002a) encontraron cambios en los niveles plasmáticos de ghrelina a lo largo del ciclo reproductor, con los valores más bajos antes y durante la freza y los más elevados después de la freza.

Las posibles variaciones diarias de los niveles plasmáticos de ghrelina han sido muy poco estudiadas hasta el momento. En humanos, las fluctuaciones diarias de la secreción de ghrelina están relacionadas con la ingestión de alimento y el sueño, de modo que, durante las horas del día, se produce un aumento en la ghrelina plasmática justo antes de cada comida, seguido por una caída postprandial (Muccioli y cols., 2002), mientras que por la noche se produce, a las 2:00 h, un único pico de mayor amplitud que los observados durante el día (Shiyya y cols., 2002). Este incremento nocturno se

amortigua cuando se priva a los sujetos de estudio del sueño, de modo que la ghrelina muestra sólo un ligero incremento hasta primeras horas de la mañana (Dzaja y cols., 2004), sugiriendo que este incremento está probablemente causado por procesos relacionados con el sueño más que por procesos circadianos. En rata los niveles de ghrelina en plasma y en estómago son altos durante el periodo de ayuno de la fase luminosa y bajos durante la noche, correlacionándose inversamente con la ingesta (Sánchez y cols., 2004). Se han descrito además ritmos ultradianos de ghrelina en ratas mantenidas *ad libitum* que se correlacionan con los episodios de alimentación que tienen lugar durante la fase oscura pero no con el patrón de sueño/vigilia (Bagnasco y cols., 2002; Tolle y cols., 2002). Sin embargo, en ovejas estos ritmos ultradianos sólo se observan cuando son alimentadas según un horario concreto, y desaparecen cuando tienen alimento disponible *ad libitum* (Sugino y cols., 2002b). Por el momento no está claro si los niveles endógenos de ghrelina influyen sobre la ingesta o si es la actividad alimentaria la que modifica los niveles de esta hormona (Tolle y cols., 2002).

### 3.2. NEUROPEPTIDO Y.

#### 3.2.1. Estructura.

El neuropéptido Y (NPY) se aisló por primera vez en 1982 a partir de extractos de cerebro porcino (Tatemoto, 1982). Perteneció a una familia de péptidos denominada inicialmente familia de polipéptidos pancreáticos, a la que también pertenecen el péptido YY (PYY), el polipéptido pancreático (PP), que sólo aparece en tetrápodos, y el péptido-tyrosina pancreático (PY), que sólo se ha encontrado en un grupo de teleósteos, los acantomorfos (Cerdá-Reverter y cols., 2000a; Conlon, 2002). Todos estos péptidos constan de 36 aminoácidos y presentan en común la amidación del extremo carboxilo terminal y dos hélices antiparalelas. Todas estas características comunes y el elevado número de aminoácidos conservados sugieren una estructura tridimensional similar en todos los péptidos pertenecientes a esta familia (Beck-Sickinger, 1997). El NPY se caracteriza por la presencia del aminoácido Tyr en sus extremos C- y N- terminales, y su estructura primaria en distintos vertebrados se muestra en el Esquema 4. El NPY se encuentra en todas las especies de vertebrados estudiadas y se conoce su estructura en numerosas especies, tanto de mamíferos como de aves, reptiles, anfibios y peces (*C. auratus*; *D. labrax*; *G. morhua*; *O. mykiss*; pintarroja menor: *Scyliorhinus canicula*; torpedo: *Torpedo marmorata*; lamprea de río: *Lampetra fluviatilis* y bagre de canal: *Ictalurus punctatus*), mostrando en todas ellas una gran similitud (Larhammar y cols., 1997; Cerdá-Reverter y Larhammar, 2000; Leonard y cols., 2001) (Esquema 4). En todas las especies estudiadas existen 22 posiciones idénticas, y las 14 posiciones variables



muestran un elevado grado de conservación en las sustituciones, de forma que sólo existe una posición que admite más de 2 aminoácidos alternativos, lo que indica que la estructura del NPY está muy conservada en la evolución (Larhammar y cols., 1997).

	1	10	20	30	36
	↓	↓	↓	↓	↓
<b>Gnatóstomo ancestral</b>	YPSKPDNPGEDAPAEDLAKYYSALRHYINLITRQRY				
<i>Homo sapiens</i>	-----M-R-----				
<i>Macaca mulata</i>	-----M-R-----				
<i>Rattus norvegicus</i>	-----M-R-----				
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	-----M-R-----				
<i>Sus scrofa</i>	-----R-----				
<i>Bos taurus</i>	-----R-----				
<i>Ovis aries</i>	-----D-----R-----				
<i>Cavia porcellus</i>	-----M-R-----				
<i>Gallus gallus</i>	-----S-----M-R-----				
<i>Alligator mississippiensis</i>	-----M-R-----				
<i>Gopherus agassizii</i>	-----M-R-----				
<i>Rana ridibunda</i>	-----M-----				
<i>Rana temporaria</i>	-----M-----				
<i>Xenopus laevis</i>	-----M-----				
<i>Xenopus laevis</i>	-----D-----M-----				
<i>Thyphlonectes nactans</i>	-----M-----				
<i>Dicentrarchus labrax</i>	--V--E-----E-----				
<i>Carassius auratus</i>	--T-----G-----E-----				
<i>Gadus morhua</i>	--I--E-----DE-----				
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	--V--E-----T-E-----T-----				
<i>Torpedo marmorata</i>	-----G-----				
<i>Scyliorhinus canicula</i>	-----G-----				
<i>Lampetra fluviatilis</i>	F-N--S-----R-L--V-----				
<b>Aminoácidos constantes</b>	-P-KP--PG--AP--A-Y--A-RHYINLITRQRY				

**Esquema 4.** Secuencia de NPY en diferentes vertebrados. Sólo se muestran las posiciones que difieren de la secuencia deducida de un gnatóstomo ancestral. Los guiones indican aminoácidos idénticos a los de esta secuencia. Es posible que en la posición 11 el gnatóstomo ancestral tuviese G en lugar de D. Las dos secuencias distintas de *X. laevis* podrían corresponder a loci separados. (Tomado de Cerdá-Reverter y cols., 2000a).

### 3.2.2. Distribución.

El estudio de la distribución de células y fibras NPY-inmunorreactivas (NPY-ir) en peces se ha realizado en especies pertenecientes a órdenes muy distintos (polipteriformes, políptero, *Polypterus senegalus*: Chiba, 1997; acipenseriformes, esturión blanco, *Acipenser transmontanus*: Chiba y Homna, 1994; diponooos, pez pulmonado africano, *Protopterus annectens*: Vallarino y cols., 1995; cipriniformes, *C. auratus*: Pontet y cols., 1989, y *T. tinca*: Bonn, 1990; salmoniformes, *O. mykiss*: Danger y cols., 1991; perciformes, *D. labrax*: Cerdá-Reverter y cols., 2000b; ateriniformes, pejerrey,

*Odontesthes bonariensis*: Traverso y cols., 2003; siluriformes, clarias, *Clarias batrachus*: Gaikward y cols., 2004) y, al igual que en los mamíferos, la distribución del NPY en el SNC es heterogénea, identificándose material NPY-ir en distintas regiones encefálicas, con altas concentraciones en el diencefalo, una densa red de fibras en la eminencia media, y coexistiendo con catecolaminas en determinadas regiones como el *locus coeruleus* (Pontet y cols., 1989). Además, se ha hallado expresión de ARNm de tipo NPY-“like” en el telencéfalo caudoventral, el área preóptica, el tálamo, el techo óptico y el hipotálamo caudal del salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y del salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Silverstein y cols., 1998). También se ha detectado expresión de NPY en los circuitos visuales, gustativos y olfatorios que envían proyecciones hacia centros hipotalámicos implicados en el control de la alimentación en los peces (Cerdá-Reverter y cols., 2000b).

En la tenca se han encontrado cuerpos neuronales con una intensa inmunoreactividad frente a NPY en distintos núcleos diencefálicos, y neuronas inmunoreactivas dispersas en regiones como el mesencéfalo y el bulbo raquídeo. También se ha descrito la presencia de fibras y axones inmunoreactivos a NPY en el bulbo olfatorio, en áreas dorsales y laterales del telencéfalo, y formando conexiones entre el núcleo posterior periventricular y el núcleo del receso lateral, en el hipotálamo ventral, en regiones laterales de la hipófisis y en el lóbulo inferior del diencefalo caudal (Bonn, 1990).

A nivel periférico, en ciertos peces, se ha demostrado la presencia de material NPY-ir en el páncreas endocrino y en el intestino (Cheung y cols., 1991), en el estómago (Karila y cols., 1997) y en el ovario (Leonard y cols., 2001).

### 3.2.3. Receptores y mecanismo de acción.

Todos los receptores de NPY conocidos hasta el momento pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Larhamar, 1997; Blomqvist y Herzog, 1997; Larhamar y cols., 2001). La activación de estos receptores inicia una cascada de respuestas celulares vía adenilato ciclasa, inhibiendo la síntesis de AMPc, utilizando calcio como segundo mensajero o mediante la activación de canales de potasio. La unión tanto de ligandos endógenos como sintéticos a los receptores de NPY es saturable y de alta afinidad, con una constante de disociación ( $K_D$ ) en el intervalo nanomolar.

En mamíferos se han identificado seis subtipos de receptores de NPY denominados Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 e Y6 (Larhammar, 1997; Blomqvist y Herzog, 1997;

Balasubramaniam, 2003). En peces se han clonado y caracterizado varios subtipos de receptores de NPY: los Ya, Yb e Yc en el pez cebra (Lundell y cols., 1997; Ringvall y cols., 1997; Starback y cols., 1999), el Yb de *G. morhua* (Arvidsson y cols., 1998), y el Yb de la trucha arcoiris (Larson y cols., 2003). Los tres subtipos están acoplados a adenilato ciclasa, muestran una elevada afinidad por el NPY y el PYY (intervalo picomolar) y han sido detectados con mayor intensidad en el encéfalo, localizándose además en órganos como el intestino y el ojo, al menos el subtipo Yb. Presentan más características similares a la subfamilia Y1-Y4-Y6 que a los receptores Y2 ó Y5 de mamíferos; sin embargo, sólo tienen un 45-50% de identidad en la secuencia de aminoácidos, por lo que son considerados como tres subtipos diferentes a los hallados hasta el momento en mamíferos. Por lo tanto, en los peces podría existir una familia de receptores para NPY diferente a la familia de receptores descrita en los mamíferos, lo que representaría un caso único desde un punto de vista evolutivo. Otra posibilidad es que aún no se haya conseguido detectar en los peces los subtipos descritos en mamíferos y/o viceversa (Larhammar y cols., 1997). Por otro lado, se ha sugerido que el subtipo Ya de los teleosteos es el ortólogo del subtipo Y4 de los mamíferos, mientras que los subtipos Yb e Yc son el resultado de una duplicación de un subtipo pro-ortólogo Yb/c que probablemente se ha perdido en los mamíferos (Salaneck y cols., 2001). En un estudio reciente realizado en *D. rerio* se ha clonado, caracterizado y determinado tanto la localización cromosómica como la distribución tisular de un nuevo subtipo de receptor de NPY al que han denominado Y7, que presenta una mayor similitud con el receptor Y2 (con una identidad del 51-54%) (Fredriksson y cols., 2004).

En cuanto a la localización de los receptores en los peces se han identificado sitios de unión para NPY en el cerebro de la perca plateada (*Bairdiella chrysoura*) (Okita y cols., 1991), el gatuso (*Mustelus canis*) (McVey y cols., 1996), *P. annectens* (Vallarino y cols., 1998) y *C. carpio* (Pirone y cols., 2003). En el encéfalo de *C. carpio* los sitios de unión para NPY presentan una amplia distribución que se corresponde bastante bien con la distribución de elementos NPY-ir.

La degradación del NPY en la periferia se lleva a cabo por acción de distintas peptidasas, como la aminopeptidasa P, la dipeptidilpeptidasa IV y la endopeptidasa-2 (Balasubramaniam, 2003). En el SNC, la terminación de la acción del NPY una vez liberado a la brecha sináptica podría realizarse por dos mecanismos diferentes. Por un lado, puede ser degradado por una proteinasa perteneciente a la familia de las aspartato proteasas, o bien puede tener lugar una internalización y metabolismo de los complejos NPY-receptor tras la activación del receptor (Stenfors y cols., 1997).

### 3.2.4. Actividades biológicas. Regulación de la ingesta y el estado nutricional.

En los mamíferos, numerosos estudios han puesto de manifiesto la participación del NPY en el control de variadas funciones fisiológicas (secreción de GH y gonadotropinas, presión arterial, ansiedad, memoria, secreción intestinal) y comportamentales (comportamiento sexual y alimentario) (Markiewicz y cols., 2003; Konturek y cols., 2004; Jones y cols., 2004).

En los teleósteos, el NPY estimula la secreción de GH y gonadotropinas (Peng y cols., 1990), interviniendo en la regulación del crecimiento y la reproducción (Peng y cols., 1993). Además, en base al hallazgo de material inmunorreactivo frente a NPY en el sistema visual de *C. batrachus*, se ha sugerido que el NPY podría estar implicado en el procesamiento de la información quimiosensorial (Gaikwad y cols., 2004). Varios estudios relacionan al NPY con el comportamiento alimentario (Silverstein y cols., 1998; López-Patiño y cols., 1999; Narnaware y cols., 2000; Volkoff y cols., 2003). La administración intracerebroventricular (ICV) de NPY en *C. auratus* incrementa la ingesta (López-Patiño y cols., 1999; Volkoff y cols., 2003), mientras que la administración intraperitoneal (IP) no afecta al comportamiento alimentario (López-Patiño y cols., 1999), lo que indica que el NPY en teleósteos ejerce una acción central sobre la ingesta, como también sucede en otros vertebrados: reptiles (Morris y Crews, 1990), aves (Richardson y cols., 1995) y mamíferos (Wieland y cols., 2000). El subtipo de receptor implicado en la regulación del comportamiento alimentario ha sido descrito como Y1-“like” (Silverstein y cols., 1998; Narnaware y Peter, 2001a; De Pedro y cols., 2000), coincidiendo con lo encontrado en mamíferos, en los que tanto el subtipo Y1 como el Y5 intervienen en la regulación de la ingesta en la rata (Inui, 1999; Chamorro y cols., 2002), si bien la contribución de ambos subtipos parece diferir entre especies (Lecklin y cols., 2002).

El mecanismo de acción por el que el NPY estimula la ingesta en los peces aún no se conoce. Se ha observado que la administración de naloxona, antagonista general de los péptidos opioides, disminuye la ingesta estimulada por NPY en *C. auratus* (De Pedro y cols., 2000), igual que sucede en mamíferos (Levine y Billington, 1997). Estos resultados sugieren la existencia de una interacción entre el NPY y el sistema opioide en la regulación del comportamiento alimentario en vertebrados, en la que el NPY participaría en la iniciación de la alimentación, mientras que los péptidos opioides se encargarían de su mantenimiento. Por otro lado, tanto en mamíferos (Yoshihara y cols., 1996; Levine y Billington, 1997) como en peces (Silverstein y cols., 1998; López-Patiño y cols., 1999), el NPY parece estar implicado en la estimulación de la ingesta inducida por ayuno. Se ha detectado un incremento en la expresión del ARNm de NPY en el

hipotálamo tras un ayuno agudo (3 días) en el carpín (Narnaware y Peter, 2001b) y prolongado (3 semanas) en el salmón del Pacífico (Silverstein y cols., 1998). Recientemente, se han demostrado también en peces modificaciones de la expresión génica de NPY en el encéfalo de carpín en respuesta a variaciones en la composición de la dieta (Narnaware y Peter, 2002).

### 3.2.5. Ritmos anuales y diarios.

El primer estudio que analiza posibles variaciones diarias en el contenido de NPY se realizó en 1990 por Jhanwar-Uniyal y colaboradores en la rata, encontrando interesantes diferencias entre núcleos encefálicos. Así, la concentración de NPY en el NSQ y el ARC sigue un ritmo bimodal significativo con un pico inmediatamente antes del inicio de la escotofase y otro al inicio de la fase luminosa; mientras que en la división parvocelular del núcleo paraventricular (NPV) el ritmo es unimodal, con la acrofase antes del inicio de la fase oscura. En otras áreas hipotalámicas, como la división magnocelular del NPV, el núcleo dorsomedial, el núcleo ventromedial o la eminencia media, no se hallaron ritmos diarios del neuropéptido. También Shinohara e Inouye (1995) han descrito un ritmo diario en la densidad de fibras NPY-ir en el NSQ. Concretamente, en ratas mantenidas en condiciones L/D el contenido de NPY del NSQ aumenta después de la transición L/D o D/L, mientras que estos cambios no se producen en ratas mantenidas en oscuridad constante, si bien este patrón bimodal no se ha hallado en todas las especies (Reuss y Olcese, 1995). El ritmo bimodal observado en el NSQ podría estar relacionado con el papel que este núcleo hipotalámico desempeña en el control y mantenimiento de la mayoría de los ritmos circadianos de los vertebrados (Moore y Card, 1989).

Xu y colaboradores (1999) mostraron que la expresión génica hipotalámica de péptidos estimuladores del apetito (NPY, galanina, POMC) es elevada durante la fase luminosa, unas horas antes del inicio de la actividad alimentaria, cuando los niveles de leptina son mínimos. Concretamente, se ha encontrado un ritmo diario de expresión del ARNm del NPY en el hipotálamo de ratas mantenidas bajo un fotoperiodo 12L:12D y 14L:10D, con los valores más altos 2-4 h antes del inicio de la fase oscura (Akabayashi y cols., 1994; Xu y cols., 1999). Este ritmo desaparece cuando se restringe la disponibilidad del alimento a 4 h al día durante la fase luminosa (de 11:00 a 15:00) durante 4 semanas.

Además de las variaciones diarias se han descrito variaciones estacionales en la densidad de fibras NPY-ir en el NSQ del jerbo (*Jaculus orientalis*) (Lakhdar-Ghazal y cols., 1995), mostrando valores más elevados en otoño (periodo de reposo sexual) que en primavera-verano (periodo de actividad sexual). En otras especies estas variaciones son independientes de los niveles de esteroides sexuales circulantes y podrían depender

del fotoperiodo. Pruebas a favor de esta posibilidad se han encontrado en el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*), en el que los fotoperiodos cortos producen un incremento en el número de neuronas NPY-ir en la hoja intergeniculada que proyecta fibras al NSQ (Jacob y cols., 1998). Sin embargo, en el hámster siberiano (*Phodopus sungorus*) se ha observado que los cambios en el fotoperiodo no afectan a la expresión del ARNm del NPY en el ARC (Mercer y cols., 2000).

Hasta la fecha no existe ningún estudio en la bibliografía que analice ni variaciones diarias ni estacionales de NPY en los peces.

### 3.3. LEPTINA.

#### 3.3.1. Estructura.

Zhang y colaboradores (1994), mediante el uso de técnicas de clonación posicional, identificaron una proteína de 167 aa producto del gen *obese* (*ob*) a la que denominaron leptina (derivada del griego "leptos", que significa delgado). Los análisis posteriores de la estructura cristalina de la leptina, mediante técnicas de resonancia magnética nuclear, revelaron que presenta 4 hélices, A, B, C y D, y un único puente disulfuro que une cisteínas dentro de las hélices C y D, y que es indispensable para la actividad biológica de esta hormona (Zhang y cols., 1994; Cohen y cols., 1996). La leptina contiene un péptido señal de 21 aminoácidos que es escindido, rindiendo una proteína circulante no glicosilada de 16kDa y 146 aa. La secuencia de aminoácidos de la leptina humana presenta una identidad del 85% respecto a la leptina murina y un 84% con la leptina de rata, mientras que la leptina de ratón y la de rata muestran un 96% de identidad en su estructura primaria (Zhang y cols., 1994; Ogawa y cols., 1995).

Hasta el momento, la leptina sólo ha sido aislada en mamíferos y aves (Doyon y cols., 2001); sin embargo, datos recientes sugieren que también puede expresarse en otros grupos de vertebrados (Jensen, 2001). De hecho, se ha descrito material leptina-"like" inmunorreactivo en anfibios (Muruzábal y cols., 2002), reptiles (Paulocci y cols., 2001; Muruzábal y cols., 2002) y peces (Johnson y cols., 2000; Yaghoubian y cols., 2001; Muruzábal y cols., 2002; Mustonen y cols., 2002a).

#### 3.3.2. Distribución.

Inicialmente, se pensó que la leptina era secretada exclusivamente por los adipocitos maduros (Zhang y cols., 1994), pero posteriormente se demostró que, aunque la leptina es secretada principalmente por el tejido adiposo blanco, también otras células y tejidos como trofoblastos placentarios, músculo, estómago, cerebro, epitelio mamario

de primates y roedores e hígado de aves expresan esta hormona (Keisler y cols., 1999; Ahima y Flier, 2000; Ahima y cols., 2000), variando sus capacidades lipolíticas-lipogénicas en los distintos tejidos.

En un estudio reciente, Johnson y colaboradores (2000) mostraron la expresión de leptina en corazón, hígado, cerebro y sangre de *L. cyanellus*, perca americana (*Micropterus salmoides*), pez sol (*Lepomis macrochirus*) y perca amarilla (*Pomoxis annularis*), y en sangre de *O. mykiss* e *I. punctatus*. También en la lota se ha demostrado la presencia de un péptido leptina-"like" tanto en hígado (principal sitio de almacenamiento de grasa en esta especie) como en sangre (Mustonen y cols., 2002a; Nieminen y cols., 2003). Aunque la mayor expresión aparece en el cerebro, Johnson y colaboradores (2000) atribuyen esta mayor intensidad de la señal no a la síntesis de leptina en el cerebro, sino más bien a una menor degradación, que puede deberse a la elevada densidad de receptores en el cerebro respecto a otros tejidos, con lo que la leptina unida a sus receptores podría estar protegida de la proteólisis asociada a la extracción y homogenización del tejido (Tartaglia y cols., 1995). Muruzábal y colaboradores (2002) encontraron también material inmunorreactivo frente a leptina en el estómago de *O. mykiss* y de otros poiquiloterms tanto en células endocrinas como en el plexo nervioso entérico.

### 3.3.3. Receptores y mecanismos de acción.

La gran similitud estructural entre los receptores de leptina (*Ob-R*) y los de citoquinas ha llevado a numerosos autores a considerar a la leptina como un miembro de la clase I de la familia de receptores de citoquinas (Keisler y cols., 1999). Hasta el momento, el *Ob-R* sólo ha sido identificado en aves (Richards y Poch, 2003) y mamíferos (Tartaglia y cols., 1995). Se trata de una proteína transmembrana de tipo I (extremo N-terminal extracelular) de elevada afinidad ( $K_d = 250-700$  pM). En mamíferos se han caracterizado 5 isoformas del receptor de leptina (*Ob-Ra-e*) que se producen por un mecanismo de "splicing" alternativo del gen (Li y cols., 1998).

Inicialmente los receptores de leptina se clonaron a partir de plexos coroideos (Tartaglia y cols., 1995). En el SNC se ha detectado expresión de *Ob-R* en el hipotálamo ventromedial y dorsomedial, el ARC, el hipocampo, el tálamo, el cortex piriforme y la hipófisis anterior. En la periferia, los *Ob-R* se expresan en una gran variedad de tejidos: adipocitos, hígado, páncreas (células  $\beta$  productoras de insulina), riñón, bazo, pulmón, corazón, músculo esquelético, nódulos linfáticos, tiroides, glándulas adrenales, ovario, útero, próstata, testículo, espermatozoides, cartílago-hueso fetal y folículos pilosos,

(Bates y Myers, 2003; Jope y cols., 2003), pero las posibles funciones de la leptina en estos tejidos aún no han sido determinadas.

#### **3.3.4. Actividades biológicas. Regulación de la ingesta y el estado nutricional.**

En los mamíferos, la leptina es una hormona que participa en el control de funciones muy diversas, entre las que se encuentran la función inmune, la hematopoyesis, la reproducción y, principalmente, la regulación del balance energético (Keisler y cols., 1999; Moran y Phillip, 2003; Sahu, 2004b).

Inicialmente se consideró a la leptina como una señal de saciedad, ya que su ausencia en ratones *ob/ob* se asocia con hiperfagia y obesidad (Pelleymuonter y cols., 1995). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que sus efectos son mucho más complejos que la simple supresión del apetito. Existen numerosos datos que apoyan la participación de la leptina en el control del balance energético. Se ha demostrado que existe una estrecha correlación positiva entre la expresión y secreción de leptina y la cantidad de grasa corporal, tanto en roedores como en humanos (Langendonk y cols., 1998; Meister, 2000; Sahu, 2004b). En peces (*L. macrochirus* y *P. annularis*) se ha hallado una correlación positiva entre el porcentaje de grasa corporal y las concentraciones cerebrales de leptina, pero no con sus niveles plasmáticos (Johnson y cols., 2000). También se ha descrito que la administración central y periférica de esta hormona disminuye la ingesta y el peso corporal en los vertebrados estudiados (peces: Volkoff y cols., 2003; De Pedro y cols., 2004; reptiles: Niewiarowski y cols., 2000; aves y mamíferos: Ahima y cols., 1996). Este efecto anorético es mucho más potente tras la administración central, sugiriendo que el control de la homeostasis energética por la leptina se realiza principalmente a través del SNC (Volkoff y cols., 2003). En los peces se han descrito otras acciones de la leptina, además de efectos sobre la ingesta y el metabolismo energético, como la estimulación de la secreción *in vitro* de LH y somatostatina en *D. labrax* (Peyon y cols., 2001; 2003) y de LH/FSH en *O. mykiss* (Weil y cols., 2003).

Aunque estudios preliminares pusieron de manifiesto que la administración periférica crónica de leptina en ciertos peces (*O. kisutch*, Baker y cols., 2000; *L. cyanellus*, Londraville y Duvall, 2002) no parece afectar al peso corporal, estudios posteriores han descrito resultados similares a los hallados en otros vertebrados. Concretamente en *C. auratus* la administración crónica IP de esta hormona reduce significativamente el peso corporal tras 10 días de tratamiento (De Pedro y cols., 2004).



Se han descrito correlaciones entre los niveles de leptina y el estado nutricional, con menores niveles circulantes de la hormona durante periodos de restricción del alimento o ayuno (Johnson y cols., 2000; Bagnasco y cols., 2002; Nieminen y cols., 2001). Los menores niveles circulantes de leptina en *L. cyanellus* en ayuno sugieren que también en los peces parece existir un factor leptina-“like” sensible al estado nutricional (Johnson y cols., 2000), de modo que la restricción de alimento en peces iría acompañada por un descenso en la señalización por leptina, que se traduce en un incremento de la sensibilidad para esta hormona y una atenuación de la respuesta a las señales de saciedad (Volkoff y cols., 2003). No obstante, parece existir una variabilidad interespecífica en esta relación leptina-ayuno en los peces, ya que en *O. kisutch* (Baker y cols., 2000) el ayuno no parece afectar a dicha sensibilidad. Otro de los factores que afectan a la respuesta de la leptina al ayuno puede ser la temperatura del agua, como sucede en *L. lota* (Nieminen y cols., 2003).

### 3.3.5. Ritmos anuales y diarios.

Se han descrito patrones diarios de secreción de leptina en roedores y en humanos (Licinio y cols., 1998; Xu y cols., 1999; Pu y cols., 2000; Ahima y cols., 2000; Kanabrocki y cols., 2001). Los niveles sanguíneos de leptina aumentan al inicio de la fase oscura, alcanzando el máximo en la mitad de dicha fase y disminuyendo gradualmente hasta valores mínimos que se mantienen durante la fase luminosa. Este patrón de secreción puede ser desacoplado del fotoperiodo y sincronizado por la alimentación mediante la restricción de la disponibilidad de alimento a unas pocas horas durante el periodo luminoso, de modo que el incremento en la leptina circulante tiene lugar poco después del inicio de la alimentación. Los cambios circadianos en los niveles circulantes de leptina presentan un retraso respecto al ritmo de síntesis de leptina en los adipocitos y al ritmo de expresión de los receptores hipotalámicos de esta hormona (Xu y cols., 1999). Este patrón diario además de estar sincronizado por el momento de la alimentación (Schoeller y cols., 1997) también parece estar regulado por otros factores como el sexo y las variaciones diarias de insulina y glucosa (Ahrén, 2000).

Además de las oscilaciones diarias en los niveles de leptina, se han observado marcadas variaciones estacionales en algunos mamíferos. En dos especies de cánidos, el perro mapache y el zorro ártico, los niveles de leptina son bajos en verano e inicio de otoño y aumentan significativamente en septiembre-octubre, disminuyendo rápidamente en el plazo de una semana (Nieminen y cols., 2001). El incremento observado en septiembre-octubre coincide con el aumento en el índice de masa corporal (peso/longitud) debido a un incremento en el almacenamiento de grasa. En mamíferos se

ha sugerido también la existencia de diferencias estacionales en la sensibilidad a leptina (Clarke y cols., 2000; Nieminen y cols., 2002).

En teleósteos, se ha descrito en un único estudio realizado en *L. lota*, variaciones en los niveles circulantes de leptina en relación con la freza, con niveles bajos antes y durante la reproducción y más altos después de la freza (Mustonen y cols., 2002a).

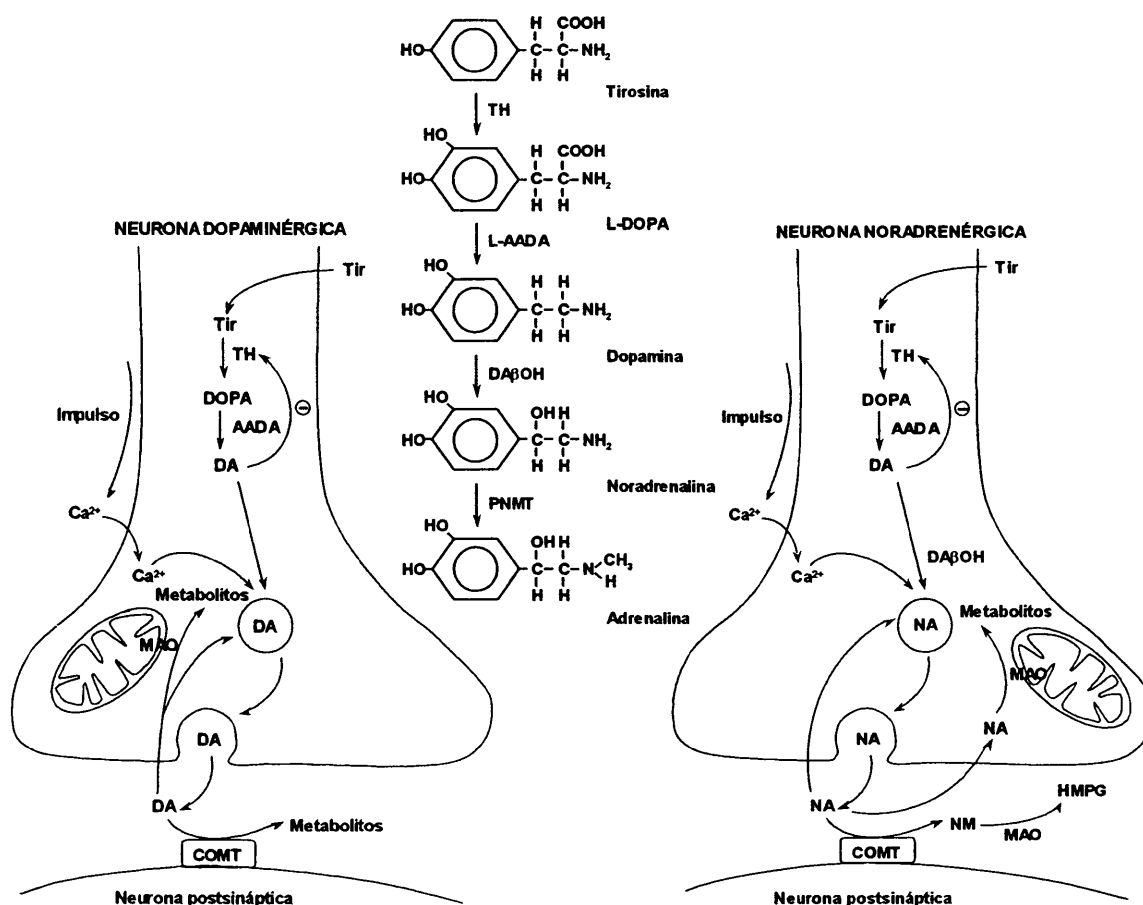
### 3.4. MONOAMINAS ENCEFÁLICAS.

En todos los grupos de vertebrados, incluidos los peces, las rutas de síntesis y degradación de las monoaminas son cualitativamente idénticas (Winberg y Nilsson, 1993).

#### 3.4.1. Síntesis y degradación.

La ruta de biosíntesis de las catecolaminas consta de cuatro etapas (Esquema 5). La tirosina es captada desde la circulación y transformada en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por acción de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima soluble presente en el citosol de todas las células sintetizadoras de catecolaminas. Esta primera etapa es el paso limitante de la ruta biosintética, estando la TH sometida a inhibición por producto final (L-DOPA y DA). A continuación, la L-DOPA es descarboxilada por acción de la L-aminoácido-aromático descarboxilasa (L-AAAD), dando lugar a dopamina (DA). En las neuronas noradrenérgicas la DA es transformada a noradrenalina (NA) por la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DA $\beta$ OH). Por último, en las neuronas adrenérgicas, la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) metila a la NA formando adrenalina (A).

Como sucede con el resto de los neurotransmisores, las catecolaminas se almacenan y concentran en vesículas que liberan su contenido al espacio sináptico cuando se despolariza la membrana presináptica. La acción de las catecolaminas es finalizada en la brecha sináptica por degradación enzimática, mediante recaptura por las propias neuronas sintetizadoras o por células gliales y degradación intraneuronal. Tras la recaptura, las catecolaminas sufren una desaminación oxidativa catalizada por la enzima monoamino oxidasa (MAO), rindiendo los correspondientes aldehídos. Los aldehídos formados pueden convertirse en el correspondiente ácido o alcohol por acción de una aldehído deshidrogenasa o una aldehído reductasa, respectivamente. Las catecolaminas de la brecha sináptica pueden ser inactivadas por la catecol-O-metil transferasa (COMT), que cataliza la metilación del grupo hidroxilo.

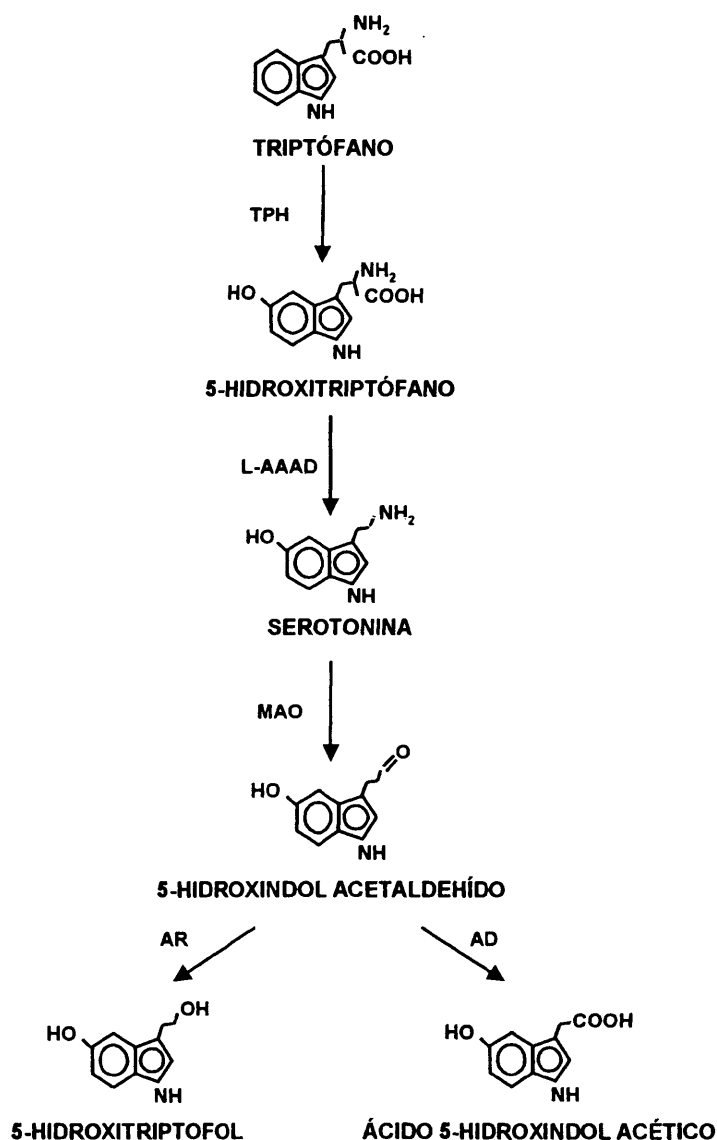


**Esquema 5.** Ruta de biosíntesis y degradación de catecolaminas. L-AAAD: L-aminoácido aromático descarboxilasa; COMT: catecol-O-metil transferasa; DA: dopamina; DAβOH: dopamina-β-hidroxilasa; HMPG: 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol; MAO: monoamino oxidasa; NA: noradrenalina; NM: normetanefrina; PNMT: feniletanolamina-N-metiltransferasa; TH: tirosina hidroxilasa; Tir: tirosina. (Modificado de Alonso-Solís, 1992).

El principal metabolito de la NA es el 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol (HMPG). En los peces, los metabolitos principales de la DA varían dependiendo de las especies, pudiendo ser ácido homovalínico (HVA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) o 3-metoxitiramina (Winberg y Nilsson, 1993). En varias especies de teleósteos pertenecientes al orden cipriniformes, el principal producto de degradación es el DOPAC (Sloley y cols., 1992).

El paso inicial en la síntesis de serotonina es el transporte facilitado del aminoácido L-triptófano desde la sangre hasta el cerebro. La ruta biosintética de serotonina (Esquema 6) implica inicialmente la conversión del L-triptófano en 5-hidroxitriptófano por acción de la L-triptófano hidroxilasa (TPH), enzima limitante de la síntesis de serotonina. Finalmente, el 5-hidroxitriptófano es descarboxilado por la acción de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (L-AADC), formándose así la serotonina (Fuller, 1985; Feldman y cols., 1997).

El metabolismo de la serotonina (Esquema 6) consiste en su oxidación por acción de la MAO, que se presenta en dos formas moleculares diferentes, la MAO-A y la MAO-B y transforma la serotonina en 5-hidroxitriptofol, que a su vez es metabolizado por una aldehído deshidrogenasa para producir ácido 5-hidroxitriptofol, metabolito principal de la serotonina. Existe además una ruta metabólica alternativa que consiste en la transformación del 5-hidroxitriptofol en 5-hidroxitriptofol por acción de una aldehído reductasa, pero esta vía se considera minoritaria.



**Esquema 6.** Ruta de biosíntesis y degradación de la serotonina. TPH: triptófano hidroxilasa; L-AAAD: L-aminoácido aromático descarboxilasa; MAO: monoamino oxidasa; AD: aldehído deshidrogenasa; AR: aldehído reductasa. (Tomado de Gómez-Jarabo, 1997).

Como en el caso de las catecolaminas, la serotonina es almacenada primariamente en vesículas y liberada por un mecanismo exocitótico dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$ . Este almacenamiento en vesículas es necesario para proteger a la serotonina de la degradación intraneuronal por la monoaminoxidasa.

### 3.4.2. Distribución.

En los peces, las células catecolaminérgicas son especialmente abundantes en el tronco cerebral y también, aunque en menor medida, en el hipotálamo, que además recibe una inervación catecolaminérgica importante (Parent, 1983; Winberg y Nilsson, 1993). En el encéfalo de teleósteos, como en otros vertebrados, la A se encuentra en concentraciones muy bajas y su función aún no es bien conocida (Nilsson, 1989; Winberg y Nilsson, 1993).

El sistema serotoninérgico central de los vertebrados es filogenéticamente antiguo y está muy conservado a lo largo de la evolución, participando en funciones similares en todos los vertebrados (Parent, 1981). En el encéfalo de los peces, las células 5-HT-ir presentan una amplia distribución, apareciendo en el telencéfalo, el diencefalo y el tallo cerebral (Cuadrado y cols., 1993; Adrio y cols., 1999; Chiba, 1999; Chiba y Oka, 1999).

### 3.4.3. Receptores.

En mamíferos se han descrito varios subtipos de receptores adrenérgicos,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , y 5 subtipos de receptores dopaminérgicos,  $D_1$ - $D_5$ . Estos receptores se localizan tanto en la neurona postsináptica, donde participan en la transducción de la señal, como en la neurona presináptica, donde regulan la liberación y recaptura del neurotransmisor.

En los peces hay pocos datos acerca de los subtipos de receptores catecolaminérgicos y de las funciones en las que están implicados. Por el momento no existen datos sobre la participación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Winberg y Nilsson, 1993), pero se han descrito algunas funciones reguladas por receptores " $\alpha_1$ -like" (Chang y cols., 1991; De Pedro y cols., 1998a), " $\alpha_2$ -like" (De Pedro y cols., 1995) y " $D_1$ -like" y " $D_2$ -like" (Sloley y cols., 1991; De Pedro y cols., 1998a).

Actualmente se han descrito 13 subtipos de receptores serotoninérgicos en humanos, que se dividen en 7 clases diferentes (5-HT<sub>1</sub>-5-HT<sub>7</sub>) y dos superfamilias: la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, cuyo segundo mensajero es el AMPc (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>5B</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>), o el inositol trifosfato (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>), y la superfamilia de canales iónicos (5-HT<sub>3</sub>)

(Chilmonczyk, 1995). Existen además varias isoformas para alguno de estos receptores con distinta distribución, lo que podría implicar funciones específicas de tejido. Las diferentes isoformas podrían diferenciarse además en las tasas de desensibilización/internalización del receptor, el tránsito intracelular y/o la eficacia de unión a proteínas G. Sin embargo, el papel preciso de estas isoformas aún no está claro (Hoyer y Martin, 1996; Barnes y Sharp, 1999).

### **3.4.4. Actividades biológicas. Regulación de la ingesta.**

La participación de las monoaminas en el control de la ingesta en los mamíferos está ampliamente demostrada, y los mecanismos implicados en esta regulación parecen ser similares en todas las especies estudiadas. Estudios realizados en mamíferos (Capuano y cols., 1992; Wellman y cols., 1993) y en aves (Hagemann y cols., 1998) revelaron que los receptores  $\alpha_1$ - y  $\alpha_2$ -adrenérgicos median acciones antagónicas, es decir, el comportamiento alimentario es estimulado por la activación de los receptores  $\alpha_2$  pero inhibido por los  $\alpha_1$ . El posible efecto de la DA sobre la ingesta es controvertido, ya que depende del área encefálica estudiada y de las dosis ensayadas. Así, mientras que la inyección de esta catecolamina en el hipotálamo lateral incrementa la ingesta de forma dosis dependiente (Shiraishi, 1991), en otros estudios se obtiene un efecto general de inhibición de la ingesta por DA (Bednar y cols., 1995; Bernardis y Bellinger, 1996; Yang y cols., 1997), contribuyendo dicha catecolamina a la finalización de la ingestión de alimento en mamíferos (Westerink y cols., 1997). En la actualidad desconocemos el posible papel de la A como mediador de la regulación del apetito en los vertebrados.

En mamíferos, la 5-HT participa a nivel central en el control del comportamiento alimentario y del peso corporal. Esta indolamina reduce la ingesta afectando tanto a la cantidad de alimento ingerido como a la frecuencia de ingestión (Blundell y Hill, 1989; Leibowitz y Alexander, 1998; Meguid y cols., 2000), estando los receptores 5-HT<sub>1B</sub> implicados en la regulación de la cantidad de alimento ingerido, y los 5-HT<sub>2C</sub> en la frecuencia de alimentación (Grignaschi y Samanin, 1992). La activación combinada de ambos subtipos de receptores 1B y 2C produciría una expresión total de saciedad de origen serotoninérgico (Simansky, 1996). Además de las acciones centrales de la 5-HT sobre la ingesta, las numerosas acciones endocrinas, neuroendocrinas y paracrinas de la 5-HT en tracto gastrointestinal y sistema vascular sugieren la participación de esta indolamina como mediador periférico de saciedad.

En los peces, estudios realizados por De Pedro y colaboradores han mostrado la relevancia del control monoaminérgico en el comportamiento alimentario en el carpín.

Así, la inyección ICV de antagonistas de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos incrementa la ingesta, mientras que la administración de antagonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos la inhibe (De Pedro y cols., 1995; 1998a). Por otra parte, la estimulación central de los receptores  $D_1$  y  $D_2$  reduce la ingesta (De Pedro y cols., 1998a), por lo que también en los peces la DA parece contribuir a la finalización de la ingestión de alimento. En cuanto a la participación de la A, la falta de modificaciones en su contenido hipotalámico tras un periodo de ayuno parece indicar que no participa de forma relevante en la regulación del comportamiento alimentario al menos en el carpín (De Pedro y cols., 2001a). Existen pocos estudios acerca de la participación de la 5-HT en la regulación de la ingesta y el estado nutricional en los peces. En un primer estudio se afirma que la 5-HT no parece ser una señal importante en el control de la ingesta de hidratos de carbono en la trucha arcoiris (Johnston y cols., 1992). Estudios posteriores demuestran en *C. auratus* un efecto anorético central de la 5-HT, mediado en parte por CRF (De Pedro y cols., 1998c).

La relevancia fisiológica de esta regulación monoaminérgica de la ingestión de alimento está corroborada por el hecho de que modificaciones agudas o crónicas en la composición de nutrientes y la restricción o privación de alimento alteran el contenido cerebral de monoaminas, tanto en mamíferos (Hajnal y Lénárd, 1997; Morien y cols., 1999; Meguid y cols., 2000) y aves (Tachibana y cols., 2001) como en peces (Johnston y cols., 1992; De Pedro y cols., 1998b, 2001a, 2003). El estado nutricional parece afectar a la actividad serotoninérgica en los peces, ya que se han encontrado incrementos del 5-HIAA y del índice de recambio de esta indolamina en el encéfalo tras distintos periodos de ayuno y restricción de alimento en la farra (*Coregonus lavaretus*) (Jobling y cols., 1999) y en *O. mykiss* (Ruibal y cols., 2002).

#### 3.4.5. Ritmos anuales y diarios.

Numerosos estudios han descrito variaciones estacionales en el contenido encefálico de monoaminas en diferentes especies de teleósteos que podrían estar relacionadas con el ciclo reproductor (Senthilkumaran y Joy, 1995, 1996; Joy y cols., 1998; Saligaut y cols., 1999; Hernández-Rauda y Aldegunde, 2002), teniendo en cuenta el papel que ejercen las monoaminas hipotalámicas (inhibidor: DA o estimulador: NA y 5-HT) sobre la secreción de la GTH II (Peter y cols., 1991).

El perfil anual del contenido hipotalámico de monoaminas depende de la especie, de manera que mientras en determinadas especies DA y NA siguen perfiles inversos a lo largo del ciclo reproductor (*Pigocentrus natus*, Guerrero y cols., 1990; *C. batrachus*, Manickam y Joy, 1990; *Heteropneustes fossilis*, Senthilkumaran y Joy, 1995), en otras,

ambas aminas siguen patrones paralelos (cabeza de serpiente, *Channa punctatus*, Khan y Joy, 1988a). En relación con el sistema serotoninérgico, mientras que en machos de pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*) no se producen modificaciones en la 5-HT hipotalámica ni hipofisaria a lo largo del ciclo reproductor (Hernández-Rauda y Aldegunde, 2002), en *C. punctatus* los niveles máximos de 5-HT se alcanzan después de la freza (noviembre) y van disminuyendo durante el periodo preparatorio (febrero) y el periodo pre-freza (mayo) (Khan y Joy, 1988a).

Las variaciones estacionales en el contenido hipotalámico de monoaminas pueden deberse no sólo a la acción de los esteroides gonadales, sino que también parecen depender del fotoperiodo y la temperatura. Así, en *H. fossilis* los fotoperiodos largos y las altas temperaturas producen un incremento en la A y la NA y en las actividades enzimáticas responsables de su síntesis (DA $\beta$ OH y PNMT), mientras que disminuyen los niveles de DA (Senthilkumaran y Joy, 1995). En la tilapia mosambica (*Oreochromis mossambicus*), la aclimatación térmica a elevadas temperaturas provoca cambios en el contenido cerebral de NA y 5-HT dependientes del sexo y la región cerebral. En el hipotálamo, el contenido de NA y 5-HT es menor a 32°C que a 26°C (Tsai y Wang, 1997).

Además de las variaciones anuales, también se han descrito ritmos diarios en el contenido hipotalámico y en la actividad neuronal monoaminérgica tanto en mamíferos (Ozaki y cols., 1993; Morien y cols., 1995, 1999; Arutiunian y cols., 2001) como en teleósteos (Khan y Joy, 1988a,b; De Pedro y cols., 1998b; Hernández-Rauda y Aldegunde, 2002). Estos ritmos diarios pueden estar influidos por la temperatura y el fotoperiodo (Khan y Joy, 1988a), o sincronizados con la ingestión de alimento (De Pedro y cols., 1998b). Además, Khan y Joy (1988b) encontraron que los ritmos diarios de monoaminas hipotalámicas y actividad MAO registrados en *Channa punctatus* varían o pueden incluso desaparecer según la estación del año.

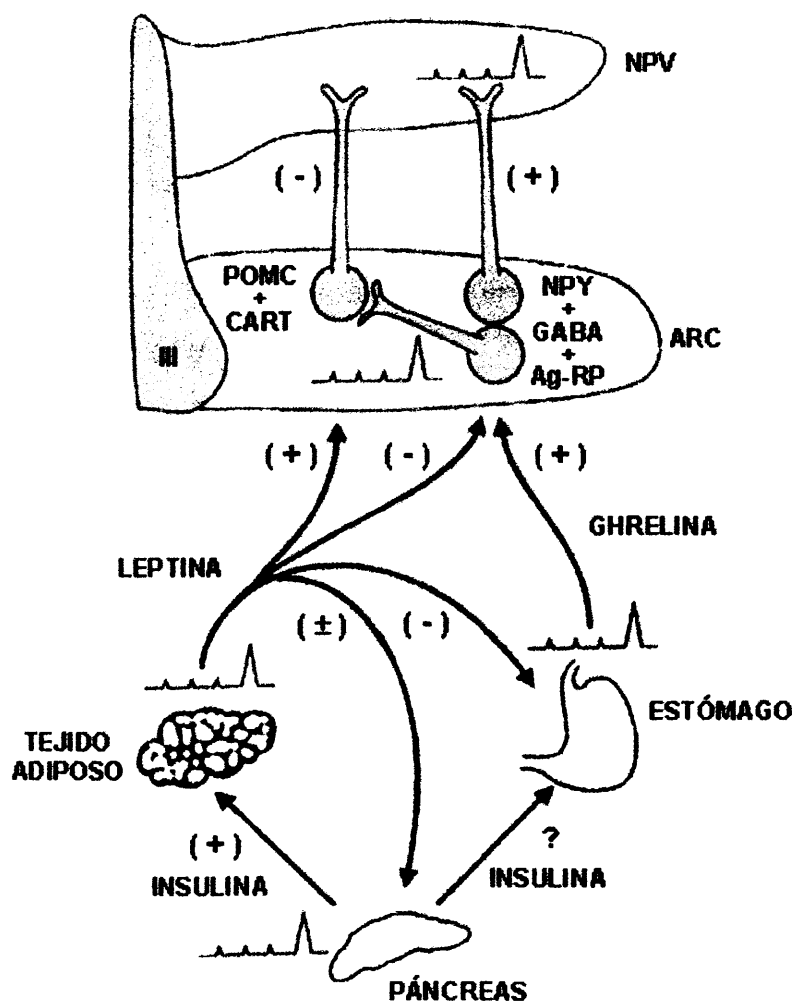
### 3.5. INTERACCIONES ENTRE DISTINTOS REGULADORES DE LA INGESTA.

Aunque es grande la complejidad existente, a continuación se resumen algunos de los datos disponibles que permiten relacionar las acciones de distintos reguladores de la ingesta y las posibles interacciones entre ellos. La leptina, secretada por el tejido adiposo blanco y el estómago, atraviesa la barrera hematoencefálica, y junto con la leptina producida localmente en el hipotálamo, parece actuar sobre distintas vías efectoras hipotalámicas reduciendo la ingesta y aumentando el gasto energético (Kalra y cols., 2003). De modo que los efectos de la leptina sobre la ingesta están mediados principalmente a nivel central, muy probablemente a través de la regulación de distintos



péptidos hipotalámicos (Ahima y cols., 2000; Williams y cols., 2001), inhibiendo las vías orexigénicas y activando las anorexigénicas (Meister, 2000) (Esquema 7). Pruebas a favor de esta posible hipótesis se han obtenido en mamíferos, donde se han identificado receptores de leptina en neuronas que contienen neuropéptidos estimuladores del apetito como NPY, galanina, Ag-RP, MCH y orexinas; y en neuronas que contienen factores anorexigénicos como péptidos derivados de POMC, transcrito regulado por anfetaminas y cocaína (CART), CRH y CCK (Ahima y cols., 2000; Meister, 2000; Williams y cols., 2001; Bouret y Simerly, 2004). Dado que NPY y leptina han sido dos de las hormonas estudiadas en esta Memoria, a continuación expondremos únicamente los datos referentes a la interacción leptina-NPY. En mamíferos, el tratamiento con leptina inhibe la ingesta inducida por NPY (Sahu, 2004b) y la expresión de este neuropéptido (Meister, 2000; Schwartz y cols., 2000). De hecho, en ratas Zucker obesas (*Lep<sup>fa/fa</sup>*), un modelo de obesidad monogénica en el que todas las isoformas del receptor de leptina presentan una mutación que hace que tanto el número de receptores de leptina en la superficie celular como su señal de transducción se encuentren disminuidos, se observa un incremento del NPY hipotalámico (White y Martín, 1997). Además, se ha demostrado la existencia de una correlación entre la disminución de leptina circulante inducida por ayuno y el incremento de la expresión de NPY en el ARC de ratas (Kowalski y cols., 2002). Estas acciones de la leptina parecen deberse a la inhibición de la vía NPY/Y1 (Stephens y cols., 1995).

Por otro lado, recientemente se ha demostrado una importante interacción antagonica entre la leptina y la ghrelina en la regulación de la ingesta y el peso corporal en los mamíferos (Shintani y cols., 2001). Entre las pruebas a favor de esta hipótesis podemos mencionar que un incremento en la expresión hipotalámica de leptina suprime el aumento del apetito inducido por ghrelina, y además la leptina periférica disminuye la secreción estomacal de ghrelina (Kalra y cols., 2003). Ghrelina y leptina comparten muchas de las vías hipotalámicas implicadas en el balance energético, presentando en general efectos opuestos. Así, se ha observado que la ghrelina inhibe a las neuronas hipotalámicas que expresan POMC y CART, activando las neuronas que coexpresan NPY/Ag-RP (Cowley y cols., 2003; Toshinai y cols., 2003). Además, el efecto orexigénico de la ghrelina se suprime tras inyección intracerebroventricular de un antagonista del receptor Y1 o de anticuerpos frente a la Ag-RP (Nakazato y cols., 2001), y se ha demostrado que el tratamiento con ghrelina incrementa significativamente el contenido hipotalámico del ARNm de NPY (Kamegai y cols., 2001; Nakazato y cols., 2001; Wang y cols., 2002b). Por lo tanto, parece probable que leptina y ghrelina compartan la vía NPY/Y1 como uno de sus mecanismos de acción en la regulación de la ingesta.



**Esquema 7.** Modelo de los circuitos de retroalimentación implicados en la integración entre la toma de energía y el gasto energético. Ag-RP: "agouti related protein"; ARC: núcleo arqueado; CART: transcrito regulado por anfetaminas y cocaína; NPV: núcleo paraventricular; POMC: proopiomelanocortina; (+): estimulación; (-): inhibición; (±): no resuelto. (Tomado de Kalra y cols., 2003).

Actualmente, los estudios realizados en *C. auratus* en el laboratorio de Volkoff y colaboradores sugieren que el efecto anorético de la leptina es mediado también en los peces por la interacción de dicha hormona con diferentes péptidos reguladores de la ingestión de alimento. Concretamente, se ha demostrado que el tratamiento con leptina acentúa el efecto anorexigénico del CART e induce un incremento en la expresión del ARNm para la forma CART I en techo óptico, hipotálamo y bulbo olfatorio de *C. auratus* (Volkoff y Peter, 2001). Además, los efectos anorexigénicos de la leptina en dicha especie parecen estar mediados, al menos en parte, por la CCK, cuya expresión en el hipotálamo se incrementa tras la administración de leptina (Volkoff y cols., 2003). En relación con las señales orexigénicas, Volkoff y colaboradores (2003) han demostrado que la administración central de leptina reduce el efecto estimulador de la ingesta

inducido tanto por NPY como por orexina-A, así como la expresión hipotalámica del ARNm del NPY, sugiriendo una interacción funcional entre la leptina, el NPY y la orexina-A en la regulación central del apetito en los peces.

Por otra parte, se ha observado que la leptina reduce las corrientes postsinápticas excitatorias en el hipotálamo (Glaum y cols., 1996), lo que ha llevado a sugerir que las catecolaminas podrían participar en las vías de señalización de la leptina en el hipotálamo. Además, el NPV, que desempeña un papel clave en la regulación de la ingesta, expresa *Ob-R* (Håkansson y cols., 1998) y está fuertemente innervado por fibras noradrenérgicas y dopaminérgicas procedentes del tallo cerebral. Se ha observado también que la administración de inhibidores de la síntesis de catecolaminas incrementa los niveles séricos de leptina (Rayner y cols., 1998). Otro hecho que sugiere la existencia de una relación entre leptina y catecolaminas es que en ratones genéticamente obesos *ob/ob* (carecen de leptina) y *db/db* (carecen de receptor funcional de leptina), los niveles hipotalámicos de NA están incrementados (Currie y Wilson, 1992). Brunetti y colaboradores (1999) han sugerido que al menos parte de los efectos anorécticos de la leptina podrían estar mediados por la inhibición de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas a nivel hipotalámico, lo que han confirmado recientemente Krügel y colaboradores (2003). En lo que respecta a las interacciones entre leptina y 5-HT en la regulación de la ingesta, los datos de los que se dispone actualmente son contradictorios. Así, mientras que en estudios *in vitro* (Orlando y cols., 2001; Hastings y cols., 2002) no se han observado modificaciones en la liberación de serotonina por sinaptosomas hipotalámicos o preparaciones de hipotálamo en superfusión tras el tratamiento con leptina, estudios *in vivo* han puesto de manifiesto un incremento en el metabolismo hipotalámico de la 5-HT tras la administración tanto crónica (Harris y cols., 1998; Calapai y cols., 1999) como aguda (Calapai y cols., 1999) de leptina. Además, Marques Telles y colaboradores (2003) observaron un incremento en la liberación de 5-HT en el hipotálamo lateral tras la administración ICV de leptina, si bien la ingesta es necesaria para que esta interacción entre ambos reguladores tenga lugar. Por otro lado, Yamada y colaboradores (1999, 2000) pusieron de manifiesto que la administración periférica de 5-hidroxitriptófano, un precursor de la serotonina, produce hiperleptinemia, pero no así la administración central de este precursor o de la propia 5-HT (Yamada y cols., 2000). Por tanto, la leptina modula la actividad monoaminérgica en el hipotálamo de los mamíferos, lo que podría parcialmente explicar su actividad anoréctica.

En relación con la ghrelina, se ha demostrado que inhibe la liberación de 5-HT en el hipotálamo, sin modificaciones en la liberación de NA y DA, sugiriendo así que el efecto

orexigénico de la ghrelina podría ser mediado, al menos en parte, por inhibición de la actividad serotoninérgica (Brunetti y cols., 2002).

Las interacciones entre el NPY y las monoaminas hipotalámicas en el control de la ingesta han sido estudiadas en profundidad, dada la similitud de los efectos de este neuropéptido y de la NA sobre el comportamiento alimentario. Así, se ha observado que el NPY produce un incremento en los niveles de DA, NA y sus metabolitos, DOPAC, ácido homovalínico (HVA) y HMPG, en distintas áreas cerebrales incluido el hipotálamo (Myers y cols., 1992; Drumheller y cols., 1994; Matos y cols., 1996). Dicho incremento se produce a una dosis de NPY que causa también un aumento en la ingestión de alimento, lo que sugiere que el incremento de la ingesta inducido por NPY podría estar asociado a la activación del sistema catecolaminérgico. Sin embargo, los efectos del NPY sobre la ingesta no cambian en presencia de antagonistas de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos o de inhibidores de la síntesis de monoaminas, sugiriendo que el incremento de la ingesta debido al NPY es independiente de la NA (Kyrkouli y cols., 1990). Además, el hecho de que las anfetaminas atenúan los efectos del NPY sobre la ingesta indica que la DA podría actuar como un antagonista del NPY en el área perifomical hipotalámica (Gillard y cols., 1993). Por otro lado, otros estudios realizados también en mamíferos sugieren que la 5-HT hipotalámica inhibe la alimentación inducida por NPY (Brown y Coscina, 1995; Currie y Coscina, 1998). Además, se ha observado una reducción o un incremento en el contenido hipotalámico de NPY tras el tratamiento con agonistas o antagonistas serotoninérgicos, respectivamente (Smialowska y Legutko, 1991; Dryden y cols., 1993). Por el contrario, ni los niveles hipotalámicos de 5-HT, ni los de su metabolito, el 5-HIAA, se modifican por la inyección ICV de NPY a una dosis efectiva en la inducción del comportamiento alimentario (Matos y cols., 1996).

#### 4. MELATONINA.

Los primeros datos acerca de la existencia de un compuesto procedente de la glándula pineal con carácter endocrino los proporcionaron Mc Cord y Allen en 1917, quienes, tras añadir extractos de pineales de bóvidos al agua de acuarios en los que se desarrollaban larvas de *Rana pipiens*, observaron un palidecimiento de las mismas. Posteriormente, en 1958, el dermatólogo Aaron Lerner y colaboradores identificaron el compuesto químico presente en estos extractos de pineal como N-acetil-5-metoxitriptamina, a la que se denominó melatonina (MEL) por su capacidad para agregar los melanóforos dérmicos de las larvas de los anfibios. A partir de este estudio se realizaron numerosos trabajos gracias a los que se consiguió determinar la existencia en la glándula pineal de distintas actividades enzimáticas específicas de la

síntesis de MEL. Dado que los primeros intentos para demostrar la presencia de estas actividades enzimáticas fuera de la glándula pineal no tuvieron éxito, se consideró esta glándula como la única fuente de MEL del organismo, pero actualmente está ampliamente demostrada la presencia de las enzimas responsables de la síntesis de MEL en localizaciones distintas de la pineal (glándula de Harder: Balemans y cols., 1983; intestino: Bubenik, 1977, y retina: Nowak y Zawilska, 1994).

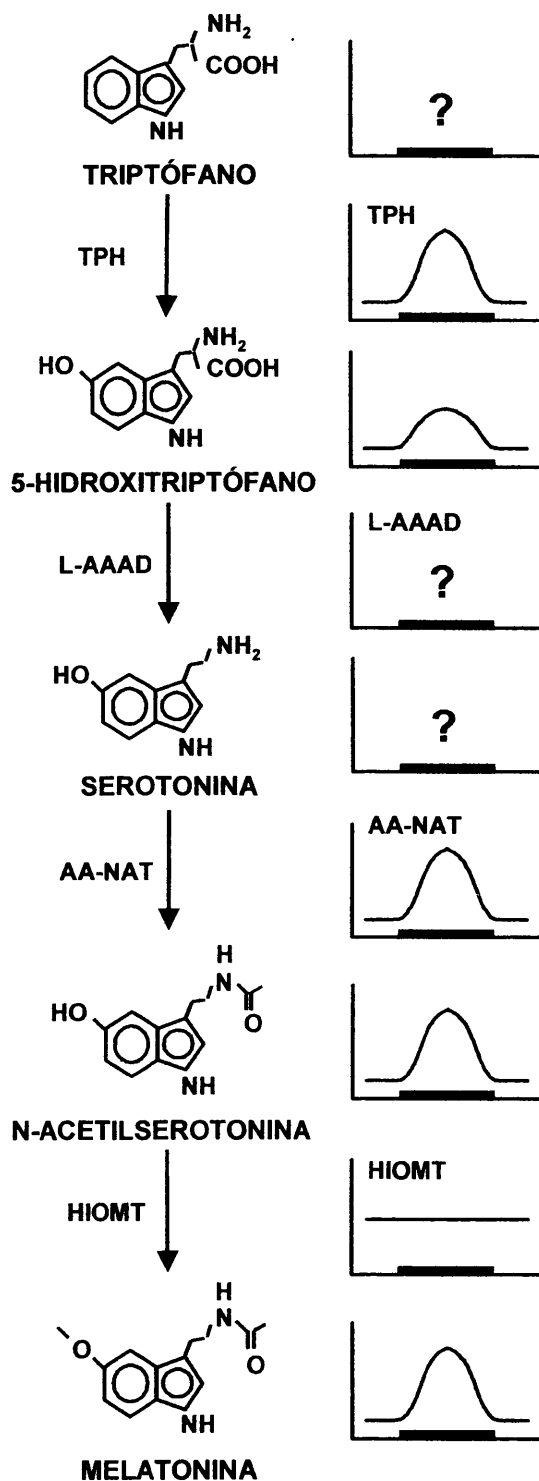
#### 4.1. SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN.

La síntesis de MEL muestra un patrón rítmico diario, en general con valores nocturnos superiores a los diurnos en todos los vertebrados estudiados, tanto especies diurnas como nocturnas (Reiter, 1991). La ruta biosintética es común en todos los tejidos analizados y está muy conservada en todas las especies examinadas. En ella intervienen cuatro actividades enzimáticas de forma consecutiva (Esquema 8): triptófano hidroxilasa (TPH), L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT) e hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), siendo las dos primeras comunes a la ruta biosintética de la serotonina.

El primer paso en la ruta de síntesis de la MEL es la captación de triptófano de la circulación sanguínea mediante transporte activo. El triptófano es transformado en 5-hidroxitriptófano por acción de la triptófano hidroxilasa (TPH, E.C: 1.14.16.4.). Tanto los niveles de TPH como la expresión de su ARNm muestran variaciones día/noche, con niveles nocturnos elevados, tanto en la glándula pineal (Bégay y cols., 1998; Privat y cols., 1999) como en la retina (Cahill y Besharse, 1990; Valenciano, 1998; Privat y cols., 1999) de varias especies.

El 5-hidroxitriptófano es descarboxilado por acción de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC, E.C. 4.1.1.28.) rindiendo serotonina. La arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT, E.C. 2.3.1.5.) cataliza la acetilación de la serotonina en su extremo N-terminal. Se considera a la AA-NAT la enzima limitante de la ruta biosintética de la MEL, ya que su actividad varía a lo largo del ciclo luz/oscuridad de forma paralela a los niveles de MEL, incrementándose tanto los niveles de mensajero como la actividad enzimática de la enzima durante la fase oscura del fotociclo diario.

La hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT; E.C. 2.1.1.4.) es la enzima encargada de catalizar el último paso de la ruta de biosíntesis de la MEL, que consiste en la metilación del grupo hidroxilo en la posición 5 del anillo indólico (Zawilska y Nowack, 1992). La HIOMT sólo se expresa en aquellos tejidos productores de MEL. Los resultados acerca del ritmo día/noche de esta enzima no son claros, mientras que algunos estudios no



**Esquema 8.** Ruta biosintética de la melatonina en la retina y la pineal de los vertebrados. Las gráficas de la derecha muestran el perfil del ritmo diario de la actividad de las enzimas de la ruta y el contenido de los compuestos intermedios y de melatonina en la retina. TPH: triptófano hidroxilasa; AAAD: L-aminoácido aromático descarboxilasa; AA-NAT: Arilalquilamina-N-acetiltransferasa; HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa. La barra negra indica el periodo de oscuridad.

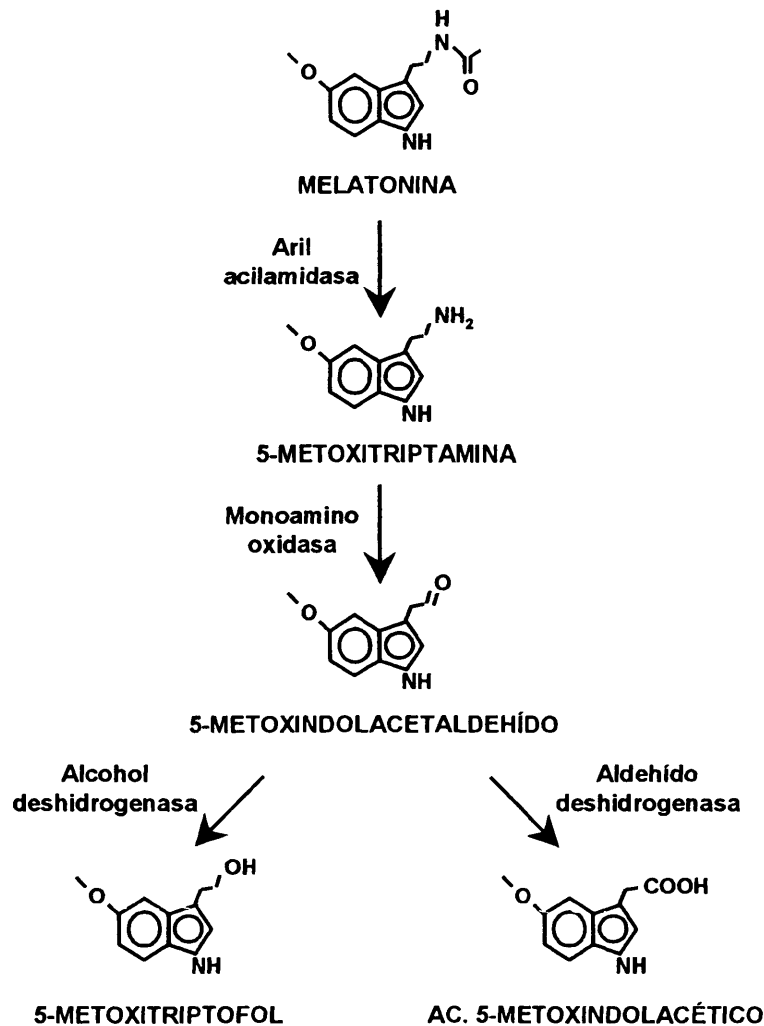
observan oscilaciones diarias a lo largo del día (Gern y cols., 1984; Zawilska y Nowak, 1992), otros describen una ligera variación diaria de sus niveles (Ribelayga y cols., 1997; Fernández, 1999).

La melatonina se metaboliza siguiendo varias vías distintas; en la periferia es catabolizada principalmente en el hígado, donde sufre una hidroxilación en la posición 6 del anillo indólico y una posterior conjugación con grupos sulfato o ácido glucurónico, aumentando así su solubilidad en un medio acuoso. Estos compuestos se excretan por la orina de forma rápida (Reiter, 1984; Arendt, 1985), estimándose la vida media de la MEL en el plasma de los mamíferos en unos 20 minutos (Gibbs y Vriend, 1981). La degradación intraocular e intrapineal de MEL ha sido descrita en varias especies de vertebrados (Cahill y Besharse, 1989; Grace y cols., 1989; Nowak, 1990). Consta de varias etapas consecutivas (Esquema 9) que incluyen una desacetilación de la indolamina por acción de la arilacilamidasa (aril-acilamina amidohidrolasa, E.C. 2.5.2.13) rindiendo 5-metoxitriptamina, sustrato de la monoamina oxidasa (MAO), que cataliza una desaminación oxidativa de esta molécula. El producto resultante (5-metoxindolacetaldehído) puede experimentar alternativamente una reducción o una oxidación, originándose 5-metoxitriptofol o ácido 5-metoxindolacético, respectivamente, metabolitos finales de la degradación de MEL en el ojo.

#### 4.2. SECRECIÓN.

La MEL es una molécula muy lipófila que no se almacena en vesículas, de modo que los cambios en su síntesis generan directamente cambios en su liberación. Esta característica estructural de la MEL determina que pueda alcanzar cualquier parte del organismo, de modo que el ritmo diario de MEL plasmática lleva información ambiental a todos los órganos y tejidos, desempeñando así un importante papel en la sincronización de diferentes ritmos diarios y anuales (Reiter, 1993; Arendt, 1998).

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento ha demostrado que la MEL presente en el plasma de los mamíferos procede en su mayor parte de la glándula pineal, siendo la melatonina circulante de origen ocular prácticamente despreciable. En estos vertebrados, la MEL sintetizada en la retina actúa principalmente de forma local modulando diversos aspectos de la fisiología intraocular (Pang y Allen, 1986; Cahill y Besharse, 1995; Iuvone y Alonso-Gómez, 1998). Sin embargo, en otros vertebrados, como *Rana perezi*, la retina es la fuente principal de MEL del organismo, mostrando el perfil diario de MEL circulante un estrecho paralelismo con el perfil ocular (Delgado y Vivien-Roels, 1989).



**Esquema 9.** Ruta de degradación de la melatonina en la retina y la pineal de los vertebrados.

#### 4.3. RECEPTORES DE MELATONINA.

En los mamíferos, hasta el momento, se han identificado dos subtipos de receptores de MEL de alta afinidad (Reppert y cols., 1996; Von Gall y cols., 2002). Estos receptores,  $Mel_{1a}$  y  $Mel_{1b}$ , también denominados MT1 y MT2, respectivamente (Dubocovich y cols., 2002), pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Reppert, 1997). En vertebrados no mamíferos se ha descrito, además de los dos subtipos anteriores, un tercer subtipo de receptor de alta afinidad denominado  $Mel_{1c}$  (Reppert y cols., 1995). Además, se ha identificado un sitio de unión para MEL, de baja afinidad, denominado MT3. Este sitio no es un receptor acoplado a proteínas G, sino que parece tratarse de una proteína con actividad enzimática, muy similar a una quinona reductasa (Nosjean y cols., 2000).



Existe una amplia distribución de sitios de unión de MEL en distintas regiones del sistema nervioso central de los mamíferos, como el NSQ (Masson-Pévet y cols., 1996a,b), el NPV (Recio y cols., 1996), el hipotálamo ventromedial (Malpaux y cols., 1998), la *pars tuberalis* (Masson-Pévet y cols., 1996b), el hipocampo (Wan y cols., 1999) y la retina (Dubocovich y Takahashi, 1987; Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1991). En el encéfalo de los peces, tanto los sitios de unión a MEL (Davies y cols., 1994; Pang y cols., 1994a; Gaildrat y cols., 1998; Gaildrat y Falcón, 1999; Iigo y cols., 1994a, 1997a; Mazurais y cols., 1999; Alonso-Gómez y cols., 2004; Bayarri y cols., 2004) como la expresión de los genes que codifican para los receptores (Mazurais y cols., 1999) presenta una distribución mucho más amplia que en el encéfalo de los mamíferos (Vaneček, 1998). En general, en todas las especies de peces estudiadas se ha demostrado la existencia de receptores de MEL de alta afinidad distribuidos principalmente en áreas asociadas con funciones de percepción e integración visual (Gaildrat y Falcón, 1999; Mazurais y cols., 1999; Gaildrat y cols., 2002; Alonso-Gómez y cols., 2004; Bayarri y cols., 2004).

En cuanto a la relación entre la distribución de los receptores de MEL y su funcionalidad, se ha propuesto que los receptores del NSQ en los mamíferos estarían implicados en la sincronización de distintas funciones circadianas (Armstrong y cols., 1986; Cassone, 1990), los del NPV del tálamo actuarían como relevo de la información circadiana entre el SNC y el sistema límbico (Krause y Dubocovich, 1990), los de la *pars tuberalis* y la eminencia media hipofisaria mediarían efectos estacionales de la MEL sobre el sistema neuroendocrino (Lincoln y Richardson, 1998; Morgan, 2000), y los sitios de unión de MEL presentes en la retina participarían en las respuestas adaptativas del ojo a la visión nocturna (Wiechmann, 1986; Redburn y Mitchell, 1989).

Además de la localización central de los receptores de MEL, algunos estudios han demostrado la presencia de receptores de MEL en una gran variedad de tejidos periféricos. Por ejemplo, se han encontrado receptores de MEL en distintas localizaciones del aparato reproductor de aves (Ayre y Pang, 1994; Murayama y cols., 1997) y mamíferos (Shiu y cols., 1998), en intestino delgado y riñón de coballa (Song y cols., 1997), glándula mamaria de ratón (Recio y cols., 1994), hígado de rata (Acuña-Castroviejo y cols., 1994), bazo de rata (Rafii-El-Idrissi y cols., 1996), músculo liso del tracto gastrointestinal de pollo y codorniz (Poon y cols., 1997), vasos sanguíneos de rata (Viswanathan y cols., 1990) y pollo (Pang y cols., 2002), corazón de peces (Pang y cols., 1994b; López-Patiño, 2004) y codorniz (Pang y cols., 1996), iris, riñón, tubo digestivo, bazo e hígado de peces (López-Patiño, 2004).

Varios estudios realizados en peces sugieren la existencia de un ritmo diario en la densidad de receptores de MEL en el cerebro. Así, estudios pioneros en salmones atlánticos indican que la densidad de sitios de unión para 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina en el área preóptica es mayor durante la fase oscura que durante la fase luminosa (Ekström y Vaneček, 1992). Estudios posteriores en vertebrados han encontrado variaciones diarias en el número de sitios de unión para MEL en el carpín (ligo y cols., 1994a; 1997a); en la dorada (*Sparus aurata*) (Falcón y cols., 1996), en el lucio (Gaildrat y cols., 1998), en el salmón masu (*Oncorhynchus masou*) (Amano y cols., 2003) y en la tenca (López-Patiño, 2004). Estos ritmos parecen estar regulados por la MEL endógena en *C. auratus*, ya que desaparecen tras la pinealectomía o la exposición a luz constante (ligo y cols., 1995), pero no en el lucio (Gaildrat y cols., 1998), donde parecen deberse a osciladores circadianos sincronizados por el fotoperiodo.

### 4.4. REGULACION AMBIENTAL DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA.

#### 4.4.1. Regulación por la luz.

El principal factor ambiental regulador de las oscilaciones diarias de la síntesis de MEL y actividad AA-NAT es el fotoperiodo. Numerosos estudios han puesto de manifiesto una acción directa de la luz anulando los ritmos diarios de actividad AA-NAT (Iuvone y Besharse, 1983; Nowak, 1990) y de síntesis de MEL (Pang y cols., 1982; Masuda y cols., 2003; ligo y cols., 2003a), siendo el incremento nocturno de la actividad AA-NAT debido a un incremento del contenido intracelular de AMPc (Zawilska y cols., 1991). Se ha demostrado en numerosas especies de vertebrados que el fotoperiodo regula la duración del incremento nocturno de MEL: peces (Kezuka y cols., 1988), anfibios (Delgado y Vivien-Roels, 1989), reptiles (Vivien-Roels y cols., 1988), aves (Underwood y Siopes, 1985; Zeman e Ilnerova, 1988) y mamíferos (Darrow y cols., 1986; Steinlechner y cols., 1987).

#### 4.4.2. Regulación por la temperatura.

Mientras que en los vertebrados homeotermos el principal factor ambiental que controla la síntesis de MEL es la luz, en los poiquilotermos la temperatura ambiental ejerce un papel clave en la regulación de los ritmos de MEL. Así, se ha descrito que la temperatura determina la amplitud del ritmo de MEL plasmática y pineal en peces (ligo y Aida, 1995; García-Allegue y cols., 2001; Masuda y cols., 2003), anfibios (Delgado y Vivien-Roels, 1989; Valenciano y cols., 1997) y reptiles (Vivien-Roels y cols., 1979; Firth y cols., 1989; Tilden y Hutchison, 1993). Estudios *in vitro* confirman esta dependencia térmica de la producción de MEL (Zachman y cols., 1992a; Boillet y cols., 1993; 1994;

Valenciano y cols., 1994), habiéndose propuesto que la máxima amplitud del ritmo de MEL coincide con la temperatura óptima de la especie (Firth y cols., 1989; Max y Menaker, 1992; Rawding y Hutchison, 1992).

Además del efecto de la temperatura sobre los ritmos estacionales de actividad AA-NAT y MEL, algunos autores han investigado la influencia de los termociclos sobre el ritmo de producción de MEL en peces (Falcón y cols., 1994; Zachman y cols., 1991), encontrando una variedad de respuestas dependiendo de la especie. En pineales de lucio cultivadas en superfusión en condiciones LD, el fotoperiodo es el estímulo predominante en la regulación del ritmo de MEL, independientemente de que la criofase coincida o no con la escotofase, si bien cuando la criofase coincide con la fase oscura se reduce la amplitud del ritmo. En condiciones DD los termociclos pueden sincronizar el ritmo de MEL que alcanza su amplitud máxima a temperatura alta (Falcón y cols., 1994).

Por tanto, en los poiquiloterms, además de la información fotoperiódica, la información térmica puede ser integrada por la pineal y/o la retina y, a través de variaciones en la producción rítmica de MEL, regular múltiples funciones estacionales en estos vertebrados.

#### **4.4.3. Regulación por la alimentación.**

Como hemos mencionado con anterioridad, la alimentación constituye un "zeitgeber" importante para el sistema circadiano; además, la presencia de MEL en el tracto gastrointestinal puede estar revelando una relación funcional entre la indolamina y el sistema digestivo. Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios dirigidos a investigar el posible papel de la alimentación como sincronizador del ritmo de MEL. Por ejemplo, la restricción del alimento incrementa la concentración plasmática de MEL en la rata (Chick y cols., 1987), pero disminuye la amplitud y avanza la fase del ritmo en la pineal (Chick y cols., 1987; Challet y cols., 1997). Una cuestión importante que permanece sin dilucidar es si estos efectos se deben a la propia restricción de alimento o más bien sería el horario de acceso a la comida el factor que interviene en la sincronización de los ritmos de MEL. En este sentido, Selmaoui y colaboradores (2001) no encontraron diferencias en los niveles plasmáticos de MEL ni en la actividad AA-NAT en pineal de ratas con libre acceso al alimento respecto a las que tenían un horario restringido de acceso éste.

### 4.4.4. Control endógeno.

El carácter endógeno o exógeno del ritmo diario de AA-NAT y MEL varía de forma notable en la filogenia. Así, en ciertas especies que poseen una pineal directamente fotosensible como *Gallus domesticus* (pollo) y *C. auratus*, el ritmo de síntesis de MEL puede estar regulado por un oscilador contenido en la propia pineal (Falcón y Collin, 1989; Kezuka y cols., 1989; Takahashi y cols., 1989), si bien especies relativamente próximas pueden mostrar patrones claramente diferentes. Por ejemplo, la retina de *X. laevis* presenta un ritmo endógeno de síntesis de MEL generado en los propios fotorreceptores (Cahill y Besharse, 1993), pero no sucede así en la retina de *Rana perezi* (Isorna, 1999). En la mayoría de las especies de peces estudiadas el ritmo de síntesis de MEL está controlado por osciladores intrapineales endógenos (*C. auratus*, ligo y cols., 1991; platija, *Platichthys flesus*, Falcón y cols., 1994; Kulczykowska y cols., 2001); sin embargo, en *O. mykiss* el ritmo diario de MEL desaparece en condiciones de curso libre (Gem y cols., 1992; Masuda y cols., 2003). Un pulso de luz durante la fase oscura reduce los niveles de MEL hasta valores comparables a los diurnos, y la exposición a oscuridad durante la fase luminosa aumenta la MEL plasmática hasta alcanzar niveles similares a los de la fase oscura (Masuda y cols., 2003), por lo que el ritmo de MEL plasmática no está bajo el control de un oscilador circadiano en este teleósteo.

### 4.5. LA MELATONINA COMO SEÑAL FOTOPERIÓDICA.

La mayoría de los vertebrados experimentan importantes cambios fisiológicos como parte de su adaptación a las fluctuaciones estacionales del ambiente. La información fotoperiódica ambiental recibida por la retina y/o la glándula pineal es conducida a través de complejas vías nerviosas y convertida en una señal neuroendocrina, la producción rítmica de MEL, que puede ser utilizada para modular y sincronizar dichos cambios estacionales en funciones fisiológicas como la reproducción, la hibernación, el equilibrio energético o los cambios estacionales de peso corporal (Arendt, 1995). Aunque no conocemos con exactitud cómo se transduce en el organismo este mensaje de MEL, se ha podido demostrar para varias especies de mamíferos que muestran un marcado carácter fotoperiódico que la duración de la producción nocturna de MEL es un factor clave en la sincronización de funciones periódicas estacionales (Bartness y cols., 1993).

Funciones básicas para los peces, como son el desarrollo, el crecimiento y la reproducción, siguen patrones dependientes del fotoperiodo y la temperatura (Boeuf y LeBail, 1999; Boeuf y Falcón, 2001). Numerosos estudios indican que la pineal media los efectos de estos factores ambientales, probablemente a través de la producción rítmica de MEL, que actuaría como transductor neuroendocrino (Zachmann y cols., 1992d; Korf y

cols., 1998; Bouef y Falcón, 2001). No obstante, existen muchos datos que revelan que las acciones de la MEL pueden ser muy variables en función de numerosos factores incluyendo el sexo, la edad, la alimentación, la época del año, el estado reproductor y, naturalmente, la especie.



## **II. OBJETIVOS**





El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido contribuir al conocimiento básico de la cronofisiología de la tenca, analizando la ritmicidad diaria y estacional de diversos parámetros centrales y periféricos (hematológicos, bioquímicos, monoaminérgicos y neuroendocrinos). Consideramos que esta información básica resulta imprescindible, como punto de partida, para la realización ulterior de investigaciones dirigidas a la mejora y optimización del cultivo de una especie, como la tenca, con un enorme potencial de aplicación en acuicultura. Con esta finalidad general hemos abordado los siguientes objetivos concretos:

1. La utilización de los parámetros sanguíneos como indicadores de las respuestas fisiológicas a cambios endógenos o exógenos está creciendo en la actualidad. La posibilidad de evaluación de estos parámetros depende de la disponibilidad de valores de referencia próximos a los valores "normales" de diferentes componentes sanguíneos que son buenos indicadores del estado de salud de los peces en condiciones naturales. Sin embargo, teniendo en cuenta la larga historia evolutiva de los peces óseos y la gran diversidad de adaptaciones a diferentes ambientes, ninguna especie puede ser utilizada como un modelo representativo para todos los peces. Por tanto, y dada la escasez de datos sobre la hematología de la tenca, un primer objetivo de este trabajo ha sido la determinación de dichos parámetros para establecer unos valores de referencia en esta especie, y sus posibles cambios diarios y estacionales.
2. El creciente interés comercial de la tenca, como especie dulceacuícola en España y algunos países centroeuropeos, estimula al desarrollo de un conocimiento lo más exhaustivo posible sobre la fisiología de esta especie. Por ello, nuestro segundo objetivo ha sido obtener una información básica sobre la composición corporal de la tenca, la contribución relativa de los distintos órganos que intervienen en el intercambio energético y la caracterización de las posibles modificaciones producidas en las principales reservas energéticas a lo largo del ciclo anual, y que en último término condicionan funciones estacionales clave, como la reproducción.
3. Recientemente se han identificado una gran variedad de reguladores centrales y periféricos de la ingestión de alimento cuyas funciones están bien conservadas en la filogenia. Nuestro equipo de investigación ha contribuido en la última década al conocimiento de la funcionalidad de dicho sistema de regulación en el grupo de los teleósteos. Uno de los objetivos que nos planteamos en la presente Memoria es determinar, por primera vez en peces, las concentraciones de algunos de estos reguladores. Teniendo en cuenta su papel en la regulación del apetito y la homeostasis

energética, aspectos que experimentan notables variaciones estacionales en los vertebrados, nos propusimos estudiar la posible ritmicidad diaria y estacional de estos reguladores, cuestión apenas conocida en la actualidad.

De la gran variedad de reguladores, centrales y periféricos, que están implicados en el control del comportamiento alimentario y el peso corporal, para el desarrollo de este objetivo hemos elegido como reguladores centrales el neuropéptido Y y las monoaminas encefálicas, de los que nuestro grupo tiene abundante información relativa a su papel regulador del apetito en el carpín. Como factores periféricos, seleccionamos la leptina, considerada como una de las señales lipostáticas más importantes de los vertebrados; y la ghrelina, que recientemente ha sido propuesta como el agente orexigénico más potente del organismo (después del NPY), aunque apenas ha sido investigada en los vertebrados no mamíferos.

4. La melatonina es considerada como el principal transductor neuroendocrino de la información ambiental y encargada de la sincronización de diferentes ritmos biológicos en vertebrados. Nuestro último objetivo sido caracterizar la síntesis rítmica de melatonina en la tenca, mediante el análisis de su producción rítmica diaria y estacional y de la enzima limitante de su ruta biosintética (la AA-NAT). Además, conocida la importancia clave que tienen la luz y la temperatura la regulación de la ritmicidad de melatonina en varias especies de vertebrados ectotermos, nos propusimos realizar un experimento encaminado a determinar el efecto de la temperatura de aclimatación en condiciones de laboratorio sobre el ritmo día/noche de actividad AA-NAT y MEL ocular. Finalmente, realizamos un último experimento con el fin de averiguar si la retina de la tenca contiene en sí misma un sistema oscilador endógeno responsable de la síntesis de melatonina en esta especie.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. MATERIALES.

### 1.1. PRODUCTOS.

#### 1.1.1. Reactivos.

- Acetil-coenzima A (A-2181, Sigma)
- 1-[<sup>14</sup>C]-Acetil-coenzima A (act. esp. 51 mCi/mmol) (CFA425, Amersham)
- Acetonitrilo grado HPLC, Chromasolv® (34851, Riedel-de Hën)
- Ácido acético (122703, Panreac)
- Ácido clorhídrico (317-Merck)
- Ácido fosfórico (141032, Panreac)
- Ácido 1-octanosulfónico, sal disódica (O-0133, Sigma)
- Ácido perclórico (Ac 1755, Scharlau)
- Ácido sulfúrico (141058, Panreac)
- Ácido tricloroacético (TCA) (252373, Panreac)
- Adrenalina (E-4250, Sigma)
- Albúmina sérica bovina (A-3803, Sigma)
- Aprotinina (A-1153, Sigma)
- Azul de cresilo brillante (B-2002, Sigma)
- Bicarbonato sódico (141638, Panreac; S-141638, Sigma)
- Bisulfito sódico (S-9000, Sigma)
- Carbonato sódico anhidro (106392, Merck)
- Cianuro potásico (20-781-0, Sigma)
- Citrato trisódico (S-4641)
- Cloroformo (141252, Panreac; 2445, Merck)
- Cloroformo grado HPLC (52-872-2, Aldrich)
- 6-Cloromelatonina (C-0331, Sigma)
- Cloruro cálcico (64244, Merck; 131221, Panreac)
- Cloruro magnésico (M-9272, Sigma)
- Cloruro sódico (141659, Panreac; S-9888, Sigma)
- DePex (18243, Serva)
- 1,4-Dioxano (141296, Panreac)
- DOPAC (Ácido 3,4-dihidroxifenilacético) (D-9128, Sigma)
- Dopamina (H-8502, Sigma)
- EDTA disódico (Ac 965, Scharlau)
- EGTA (E-4378, Sigma)
- Etanol (Et 0003, Scharlau)
- Éter dietílico (141313, Panreac)

- Fenol (131322, Panreac)
- Ferricianuro potásico (P-3667, Sigma)
- Formaldehído al 35-40% (211328, Panreac; Probus, 071510)
- Fosfato disódico (6580, Merck)
- Fosfato monosódico (6346, Merck)
- Fosfato potásico dibásico (131512, Panreac)
- Fosfato potásico monobásico (141509, Panreac)
- Giemsa (G-9641, Sigma)
- Glicerina (141339, Panreac)
- Glucógeno bovino (G-0885, Sigma)
- Helio comprimido (98583-152, Air Liquid)
- Hemoglobina bovina (H-2500, Sigma)
- Heparina al 5% (Leo)
- Hidróxido potásico (131515, Panreac)
- Hidróxido sódico (141687, Panreac)
- 5-HIAA (Ácido 5-hidroxiindolacético) (H-8876, Sigma)
- HMPG (4-hidroxi-3-metoxifenilglicol) (H-1377, Sigma)
- 2- Iodomelatonina (737, Tocris)
- 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonina (act. esp. 2000 Ci/mmol) (IM215, Amersham)
- Isoproterenol (I-6504, Sigma)
- Líquido de centelleo Fluoran-HV, Scintan® (14514, BDH Chemicals Ltd.)
- Jenner (J-1875, Sigma)
- Melatonina (M-5250, Sigma)
- Metanol (6009, Merck; 131091, Panreac)
- Nitrógeno comprimido (98583-150, Air Liquid)
- Noradrenalina (A-7257, Sigma)
- Pentano grado HPLC (27-041-5, Aldrich)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (251567, Panreac)
- Serotonina (H-7757, Sigma)
- Sulfato cúprico (52367, Probus; 141270, Panreac)
- Sulfato sódico (Panreac, 131716)
- Tartrato sódico-potásico (8087, Merck)
- Trioleína (T-7140, Sigma)
- Triptamina-HCl (T-9628, Sigma)

**1.1.2. "Kits" comerciales.**

- "Cholesterol-Trinder" (352-50, Sigma Diagnostics)
- Estándar de colesterol (C 0284, Sigma Diagnostics)
- Estándar de glicerol (G 1394, Sigma Diagnostics)
- Estándar de glucosa (16-300, Sigma Diagnostics)
- "Glucose-Trinder" (315-100, Sigma Diagnostics)
- "Triglycerides-GPO-Trinder" (339-20, Sigma Diagnostics)
- "Neuropeptide Y" RIA (Human, Rat) (S-2029, Bachem, Peninsula Laboratories, Inc.)
- "Ghrelin" RIA (Human) (S-2227, Bachem, Peninsula Laboratories, Inc.)
- "Leptin Multi-species" RIA (71430, Linco Research, Inc.)

**1.2. EQUIPOS E INSTRUMENTAL.**

- Agitadores de tubos (Heidolph, modelos Reax, 1D y 2000)
- Agitadores magnéticos (SBS, modelo A-08; Selecta, modelo Agimatic-E)
- Agitador multitubos (Corning, modelo 4010)
- Aguja de 0,5 mm x 16 mm (Microlance)
- Balanzas de precisión (Mettler-Toledo, modelo AB54; Sartorius, modelo 1405; AND, modelo EK-600H)
- Baño de órganos termostatzado (Unitronic, modelo 320 OR)
- Bomba de doble pistón para cromatografía líquida de alta resolución (Waters, modelo 590)
- Cámara de aclimatación con fotoperíodo y temperatura regulables (Koxka)
- Cámaras de conteo de células (modelo Neubauer, 0,1 mm x 0,0025 mm<sup>2</sup>, Blau Brand)
- Campana extractora
- Célula de acondicionamiento coulométrica (ESA, modelo 5011)
- Célula analítica coulométrica (ESA, modelo 5021)
- Centrífugas refrigeradas (Heraeus, modelo Megafuge 1.0 R; Sigma, modelo 3K-2; Kontron, modelo Hermle ZK 365)
- Columnas de cromatografía (Spherisob C8, 3 µm, 10 x 0,46 cm, Tracer HPLC N10280-Teknokroma y Spherisorb C 18 ODS2, 5 µm, 12,5 x 0,46 cm, PSS831916, Waters)
- Congeladores de -25°C (Liebherr) y de - 80°C (Forma Scientific 823)
- Contadores gamma (LKB, modelo 1275 minigamma y PerkinElmer lifesciences, modelo Wallac Wizard 1470 Automatic Gamma Counter)

- Cubreobjetos (22 x 22 mm, Menzel-Glaser)
- Detector coulométrico (ESA, modelo Coulochem II)
- Dispensador de comida 24 h (Corelsa, modelo Clockwork)
- Espectrofotómetro (Spectronic 1201, Milton Roy)
- Evaporador-concentrador (Howe, modelo Giro-vap)
- Filtros de poliamida 0,45 µm (Sartolon, Sartorius)
- Homogeneizador por ultrasonidos (Dr. Hielscher, modelo UP-5OH)
- Inyector manual Reodine (puerto de inyección de 20 µl)
- Inyector automático (Agilent 1100 series, modelo G 1329A ALS)
- Jeringuillas de plástico desechables 1 cm<sup>3</sup> (ICO)
- Lupas binoculares (Zeiss y Meiji EMZ-TR)
- Material de disección
- Microcentrífugas (Heraeus, modelos Biofuge 13 y Biofuge Pico)
- Microcentrífuga de hematocrito (COMPUR Electronic GMBH M 1100)
- Microjeringas de vidrio (Hamilton, 25 µl)
- Microscopio óptico (Nikon)
- Purificador de agua Mili Q (Millipak 40, Millipore)
- pH-metro (Crison, modelo GLP21)
- Picadora de hielo (Scotsman, modelo AF10)
- Pipetas automáticas (Gilson y Biohit)
- Placas Petri (60 mm)
- Portaobjetos (76 x 26 mm, Menzel-Glaser)
- Precolumnas (Tracer TR-C-160, C8, Teknokroma)
- Sistema de software Biocrom 2000 (Micron Analítica S.A.)
- Termostatizador (Agilent, modelo G 1330BA ALSTherm)
- Tubos microcapilares (32 x 0,7 mm) (COMPUR Electronic GMBH)
- Viales de vidrio (Agilent, 11 mm PP vial CRIM/SNAP 250 µl, 9301-0978)

#### 1.3. MATERIAL BIOLÓGICO: OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO.

Los peces utilizados para la realización del trabajo experimental presentado en esta Memoria son teleósteos pertenecientes a la especie *Tinca tinca* (tenca), Orden Cipriniformes, Familia *Ciprinidae* y Subfamilia *Leuciscinae*.

Las tencas procedían de las piscifactorías IPESCON (Salamanca) e INTERTENCA (Badajoz) y del Centro Regional de Acuicultura "Piscifactoría Las Vegas del Guadiana" (Badajoz).



Como tratamiento preventivo frente a posibles infecciones por bacterias u hongos y afecciones ectoparasitarias, durante la aclimatación previa a los diseños experimentales, se añade al agua de mantenimiento de los peces "General Tonic" y "Contralck" (Tetra) a las dosis recomendadas por los fabricantes, así como sal común al 0,6%.

Los peces son alimentados con pienso granulado comercial (Mubers). La ración diaria de alimento (1% del peso corporal) se les suministraba entre las 10:00 h y las 11:00 h.

La aclimatación a condiciones ambientales naturales se realizó en las dependencias de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid, en tanques de 5.000 l provistos de un sistema de renovación de agua y aireación continuas. La dieta se suplementó con rotíferos y *Daphnia sp.* Los peces aclimatados a condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo se mantuvieron en laboratorios del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Biología de la U.C.M., en tanques de 70 l con sistemas de aireación y filtración continua de agua. Los filtros (Rena 225 y 245) se limpiaban una vez por semana y el carbón de los mismos se cambiaba regularmente (aproximadamente cada dos meses).

El fotoperiodo y la temperatura utilizados en cada uno de los experimentos se detallan más adelante en los apartados correspondientes. El periodo de aclimatación de las tencas a las condiciones concretas de cada experimento es de al menos 2 semanas.

## **2. MÉTODOS.**

### **2.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.**

Las tencas se sacrifican por decapitación inmediatamente por detrás del opérculo, tras 24 h de ayuno para evitar el efecto agudo de la alimentación sobre los parámetros a determinar. La determinación del peso corporal y la longitud total se realiza antes del sacrificio.

#### **2.1.1. Sangre y plasma.**

La sangre se extrajo por punción cardiaca mediante jeringuillas de plástico de 1 cm<sup>3</sup> heparinizadas y agujas de 0,5 x 16 mm, y se recogió en tubos Eppendorf mantenidos a 4°C (baño de hielo). En el caso de la sangre destinada a los estudios hematológicos, los tubos Eppendorf contenían EDTA disódico (5 mg/cm<sup>3</sup>) como anticoagulante, mientras que la sangre destinada al análisis de la bioquímica plasmática se recogió en tubos Eppendorf previamente heparinizados (heparina al 5%). El plasma se obtuvo por centrifugación de la

sangre a 6.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante con la ayuda de pipetas automáticas y se conservó en alícuotas a -80°C hasta su posterior utilización para la determinación de colesterol, triglicéridos, glucosa y proteínas totales.

#### 2.1.2. Hígado.

Tras la decapitación, se extrajo el hígado y se determinó su peso húmedo. El órgano completo se congeló en CO<sub>2</sub> sólido y se conservó a -80°C hasta la valoración del contenido de glucógeno, lípidos y proteínas totales.

#### 2.1.3. Músculo.

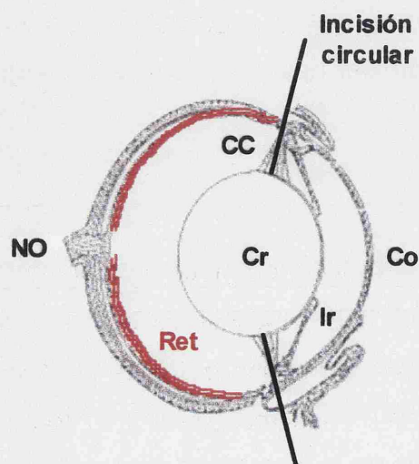
Se tomaron muestras de músculo de los paquetes dorsales y ventrales, retirando previamente la piel que cubre estas capas musculares. Las muestras así obtenidas se congelaron en nieve carbónica y se conservaron a -80°C hasta la valoración del contenido de glucógeno, lípidos y proteínas musculares.

#### 2.1.4. Gónadas.

Una vez extraídas, las gónadas se separaron cuidadosamente de la grasa y el tejido conjuntivo adyacente, y se determinó su peso húmedo.

#### 2.1.5. Copas ópticas y retinas.

Los globos oculares se extrajeron mediante tijeras curvas de cirugía. Posteriormente, y bajo la lupa, se limpió la copa óptica de restos de tejido extraocular y se realizó una incisión a nivel de la *ora serrata* utilizando unas tijeras de iridectomía, y se cortó circularmente (Esquema 10). Se separaron así la córnea y el iris, y se extrajo el



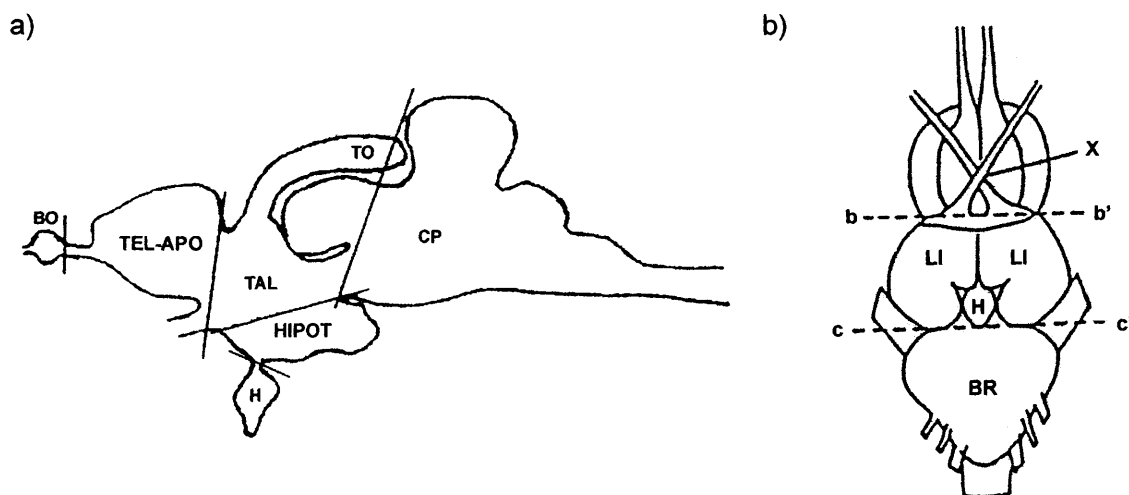
**Esquema 10.** Diagrama de un corte sagital del globo ocular. CC: Cuerpo ciliar; Co: Córnea; Cr: Cristalino; Ir: Iris; NO: Nervio óptico; Ret: Retina.

cristalino y el humor vítreo. Durante todo este proceso los ojos y las copas ópticas se mantuvieron sumergidos en TPE (véase apartado 2.5.1.b) en placas Petri de 60 mm de diámetro. Las copas ópticas así obtenidas se congelaron en CO<sub>2</sub> sólido y se conservaron a -80°C hasta la determinación de la melatonina ocular. Para la valoración de la actividad AA-NAT, una vez obtenidas las copas ópticas, las retinas neurales se separaron del epitelio pigmentado subyacente, se congelaron en 300 µl de TPE y se conservaron a -80°C.

Durante la escotofase todo este proceso de obtención y preparación de las copas ópticas y las retinas neurales se realizó bajo luz roja de muy baja intensidad.

### 2.1.6. Hipotálamo y telencéfalo.

Para la extracción del hipotálamo y del telencéfalo (Esquema 11) se separa la mandíbula inferior de la mandíbula superior y el cráneo. Con ayuda de una lupa binocular se accede al encéfalo ventralmente, diseccionando y extrayendo el hipotálamo, localizado entre el quiasma óptico y el bulbo raquídeo; y el telencéfalo, situado por delante del techo óptico y el diencefalo y por detrás de los bulbos olfatorios. El hipotálamo se dividió sagitalmente en dos mitades. La mitad del hipotálamo destinada a la determinación del contenido de monoaminas y sus metabolitos se congeló en seco en CO<sub>2</sub> sólido. La parte del hipotálamo utilizada para la valoración del contenido de NPY se congeló en 125 µl de una solución de ácido acético 2 M y aprotinina (200 µg/ml) para detener la proteólisis. Las muestras de telencéfalo e hipotálamo se conservaron a -80°C hasta su utilización.



**Esquema 11.** a) Corte sagital del encéfalo de un teleosteo mostrando la disección de distintas regiones cerebrales. BO: Bulbos olfatorios; CP: Cerebro posterior; H: Hipófisis; HIPOT: Hipotálamo; TAL: Tálamo; TEL-ÁPO: Telencéfalo-Área preóptica; TO: Techo óptico. (Tomado de Narnaware y cols., 2000). b) Vista ventral del encéfalo de un teleosteo mostrando los planos de corte transversales (bb' y cc'). BR: bulbo raquídeo; H: Hipófisis; LI: Lóbulo lateral inferior; X: Quiasma óptico. (Tomado de Senthilkumaran y Joy, 1993).

## **2.2. ÍNDICES Y PARÁMETROS BIOMÉTRICOS.**

### **2.2.1. Índices hepatosomático (HSI) y gonadosomático (GSI).**

Se calcula como:

$$\text{GSI, HSI} = \frac{P_h}{P_c} \times 100$$

donde:

$P_h$  = peso húmedo del hígado o la gónada, en gramos.

$P_c$  = peso corporal, en gramos.

### **2.2.2. Índice nutricional (IN).**

También conocido como factor de condición (K), se calcula como:

$$\text{IN} = \frac{P_c}{L^3} \times 1000$$

donde:

$P_c$  = peso corporal, en gramos.

$L$  = longitud corporal, en centímetros.

## **2.3. TÉCNICAS HEMATOLÓGICAS.**

### **2.3.1. Determinación de hemoglobina en sangre.**

La cantidad de hemoglobina se determinó usando el método de la cianometahemoglobina (Blaxhall y Daisley, 1973).

#### **a) Base teórica del método.**

La hemoglobina circulante es una mezcla de distintas formas de hemoglobina, oxihemoglobina, carboxihemoglobina y pequeñas cantidades de otras formas moleculares de este pigmento. Para realizar una valoración correcta de la hemoglobina sanguínea es necesario obtener un derivado estable que englobe a todas estas formas. Este derivado es la cianometahemoglobina, que se produce a partir de todas las formas de hemoglobina, excepto la sulfohemoglobina, por la adición de ferricianuro potásico y cianuro potásico, y presenta un máximo de absorbancia a 540 nm. La intensidad del color del producto formado es directamente proporcional a la cantidad de hemoglobina presente en la muestra.

**b) Reactivos.**

- Reactivo de Drabkin:
  - Ferricianuro potásico 20 mg
  - Cianuro potásico 50 mg
  - $H_2O_d$  1 l

**c) Procedimiento.**

- Añadir 4 ml de reactivo de Drabkin a 20  $\mu$ l de sangre.
- Mezclar por inversión e incubar durante 15 min a temperatura ambiente ( $20 \pm 2^\circ C$ ).
- Disolver el coágulo formado con una varilla de vidrio.
- Lectura de la absorbancia a 540 nm.
- Patrón de hemoglobina en el intervalo 1-16 g/100 ml.

Las determinaciones se realizaron por duplicado y se expresaron en g/100 ml.

**2.3.2. Determinación del hematocrito.**

El hematocrito se determinó utilizando una técnica de microhematocrito.

**a) Base teórica del método.**

El hematocrito es el porcentaje de células por volumen de sangre total. Al centrifugar sangre completa se forman una serie de bandas de sedimentación que pueden ser observadas a simple vista. Los glóbulos rojos se depositan en el fondo del tubo; sobre ellos se van depositando los glóbulos blancos y, finalmente en la parte superior, el plasma.

**b) Procedimiento.**

- Llenar un tubo microcapilar con cada muestra de sangre.
- Centrifugar en la centrífuga de microhematocrito durante 5 min.
- Lectura del hematocrito.

Los datos obtenidos se expresan en porcentaje.

**2.3.3. Recuento total de células sanguíneas.**

El recuento microscópico de glóbulos rojos y blancos se realizó manualmente, usando cámaras de recuento de tipo Neubauer.

**a) Reactivos.**

- Solución de Dacie modificada (Blaxhall y Daisley, 1973):
  - Citrato trisódico al 3% 990 ml
  - Formaldehído comercial 10 ml

- Azul brillante de cresilo 1 g/l

**b) Procedimiento.**

- Diluir la muestra en solución de Dacie en tubos Eppendorf (no se puede realizar en pipetas cuentaglóbulos, ya que la sangre de los peces se coagula en su interior, Blaxhall y Daisley, 1973):
  - Dilución 1/50 para el recuento de leucocitos (20 µl de sangre total en 980 µl de solución de Dacie).
  - Dilución 1/200 para el recuento de eritrocitos (5 µl de sangre total en 995 µl de solución de Dacie).
- Mezclar lentamente por inversión y esperar aproximadamente 2 min para que las células se tiñan con el azul de cresilo.
- Llenar la cámara de Neubauer y dejar unos minutos en reposo para que sedimenten las células.
- Realizar el recuento al microscopio óptico bajo objetivo 40x (contar en 4 cuadros de 0,0625 mm<sup>2</sup> para los leucocitos y 2 de 0,0625 mm<sup>2</sup> para los eritrocitos).

**c) Cálculo de los resultados.**

El número de eritrocitos y de leucocitos por mm<sup>3</sup> se calculó aplicando las siguientes fórmulas:

$$\text{nº de eritrocitos/mm}^3 = \frac{(\text{nº eritrocitos contados/nº cuadros contados})}{V_{\text{cuadro}}} \times \text{F.D.}$$

$$\text{nº de leucocitos/mm}^3 = \frac{(\text{nº leucocitos contados/nº cuadros contados})}{V_{\text{cuadro}}} \times \text{F.D.}$$

donde:

$$V_{\text{cuadro}} = 0,25 \times 0,25 \times 0,1 \text{ (mm}^3\text{)}$$

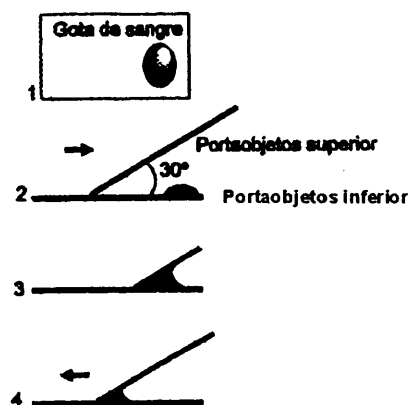
F.D.: factor de dilución de la sangre, 200 para eritrocitos y 50 para leucocitos.

**2.3.4. Recuento diferencial de glóbulos blancos.**

El análisis porcentual de los distintos elementos de la serie blanca se denomina "fórmula leucocitaria relativa". Este recuento diferencial se realizó en extensiones sanguíneas teñidas con Jenner-Giemsa, y los resultados se expresaron en porcentaje relativo de cada uno de los subtipos celulares.

**a) Preparación de las extensiones sanguíneas.**

Para la preparación de los frotis de sangre se utilizó la técnica del portaobjetos, que se realiza como muestra el Esquema 12.



**Esquema 12.** Pasos a seguir para la correcta realización de una extensión sanguínea.

**b) Fijación.**

- Fijar en metanol al 100% durante 5 min a temperatura ambiente.
- Secar al aire.

**c) Tinción de Jenner-Giemsa.****• Soluciones.**

- Solución madre de Jenner:
  - Disolver 1 g de Jenner en 400 ml de metanol absoluto.
  - Dejar reposar durante 24 h y filtrar.
- Tampón fosfato (50 mM, pH = 6,9):
 

• $\text{KH}_2\text{PO}_4$	6,8 g
• $\text{K}_2\text{HPO}_4$	8,6 g
• $\text{H}_2\text{O}_d$	1 l
- Solución madre de Giemsa:
  - Disolver 1 g de Giemsa en 66 ml de glicerina.
  - Dejar reposar durante 2 h a 56°C.
  - Añadir 66 ml de metanol al 100%.
- Solución de trabajo de Giemsa:
  - Diluir la solución madre de Giemsa en tampón fosfato (1:10).

• **Procedimiento.**

- Teñir durante 1 min con solución madre de Jenner recién filtrada.
- Pasar las extensiones a una solución al 50 % de solución madre de Jenner en tampón fosfato (10 min).
- Lavar con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> a temperatura ambiente. Secar el exceso de agua.
- Cubrir las extensiones con solución de trabajo de Giemsa durante 25 min.
- Lavar con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> a temperatura ambiente y secar al aire.

**2.3.5. Cálculo de índices corpusculares.**

La finalidad de la determinación de los índices corpusculares es relacionar los resultados obtenidos en los exámenes hemáticos de hematocrito, hemoglobina y recuento de glóbulos rojos para obtener parámetros adicionales como el tamaño y el contenido en hemoglobina de cada eritrocito, entre otros.

**a) Volumen corpuscular medio (VCM).**

Permite conocer el volumen medio de cada glóbulo rojo. Relaciona el valor del hematocrito (Htc) con la cantidad de glóbulos rojos por mm<sup>3</sup>. Se expresa en femtolitros (fl).

$$VCM = \frac{Htc \times 10}{N^{\circ} \text{ eritrocitos} \times 10^6}$$

**b) Hemoglobina corpuscular media (HCM).**

Indica la cantidad media de hemoglobina (Hb) contenida en cada glóbulo rojo. Es directamente proporcional a la concentración de hemoglobina y al tamaño del eritrocito. Se expresa en pg.

$$HCM = \frac{Hb \times 10}{N^{\circ} \text{ eritrocitos} \times 10^6}$$

**c) Concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH).**

Expresa, en porcentaje, la concentración de hemoglobina por unidad de volumen de hematíes (100 ml), es decir, es una relación entre la cantidad de hemoglobina y el volumen del glóbulo rojo.

$$CCMH = \frac{Hb \times 100}{Ht}$$



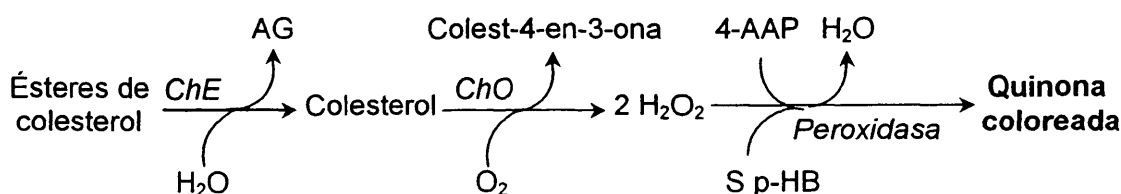
## 2.4. TÉCNICAS COLORIMÉTRICAS.

### 2.4.1. Valoración del colesterol plasmático.

La determinación de los niveles plasmáticos de colesterol total se realizó mediante un método colorimétrico enzimático, utilizando el "kit" comercial "Cholesterol-Trinder" (352-50, Sigma Diagnostics).

#### a) Base teórica del método.

Inicialmente, los ésteres de colesterol son hidrolizados por la colesterol esterasa (ChE) rindiendo colesterol y ácidos grasos libres (AG). Por acción de la colesterol oxidasa (ChO) el colesterol se oxida a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. En la última reacción catalizada por una peroxidasa, el peróxido de hidrógeno se combina con 4-aminoantipirina (4-AAP) y p-hidroxibencenosulfonato (S p-HB) para formar una quinona coloreada, con un máximo de absorbancia a 500 nm. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la concentración de colesterol total de la muestra.



#### b) Reactivos.

- Solución reactiva:

- Colesterol oxidasa (microbiana) 300 U/l
- Colesterol esterasa (microbiana) >1000 U/l
- Peroxidasa de rábano 1000 U/l
- 4-aminoantipirina (4-AAP) 0,3 mmol/l
- p-hidroxibencenosulfonato 30 mmol/l
- Tampón pH 7  $\pm$  0,1
- Estabilizantes

#### c) Procedimiento.

- Reconstituir la solución reactiva en 50 ml de  $H_2O_d$ .
- Añadir 1,5 ml de solución reactiva a 37°C a 15  $\mu$ l de muestra.
- Agitar por inversión e incubar a 37°C durante 5 min.
- Lectura de la absorbancia a 500 nm.
- Patrón de colesterol de 200 mg/100 ml.

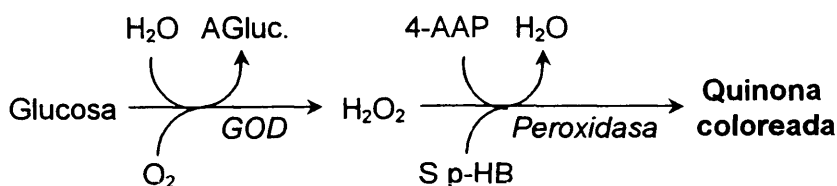
Las determinaciones se realizaron por duplicado y se expresaron en mg/100 ml.

#### 2.4.2. Valoración de la glucosa plasmática.

Los niveles plasmáticos de glucosa se determinaron mediante un método colorimétrico enzimático, utilizando el "kit" comercial "Glucose Trinder" (315-100, Sigma Diagnostics).

##### a) Base teórica del método.

En una primera reacción, la glucosa es oxidada a ácido glucónico (AGluc.) por la glucosa oxidasa (GOD), formándose peróxido de hidrógeno. En un segundo paso catalizado por la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno reacciona con sulfonato de p-hidroxibenceno (S p-HB) y 4-aminoantipirina (4-AAP) formando una quinona roja que muestra absorbancia máxima a 505 nm. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.



##### b) Reactivos.

- Solución reactiva:

- 4-aminoantipirina (4-AAP) 0,5 mmol/l
- Sulfonato de p-hidroxibenceno 20 mmol/l
- Glucosa oxidasa (*Aspergillus niger*) 15000 U/l
- Peroxidasa de rábano 10000 U/l
- Tampón pH 7 ± 0,1
- Estabilizantes

##### c) Procedimiento.

- Disolver la solución reactiva en 100 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y conservarla a 37°C.
- Añadir 3 ml de la solución reactiva a 10 µl de muestra.
- Agitar por inversión e incubar a 37°C durante 10 min.
- Lectura de la absorbancia a 505 nm.
- Patrón de glucosa en el intervalo 37,5-600 mg/100 ml.

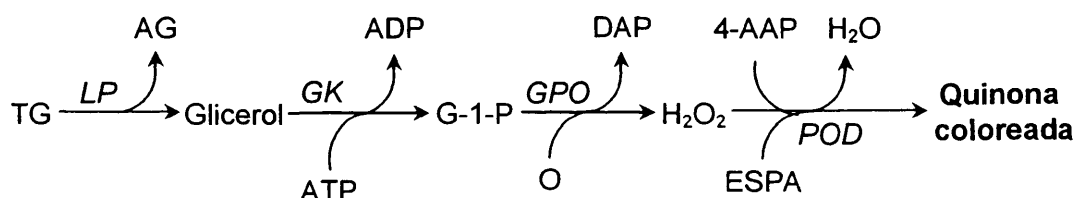
Las determinaciones se realizaron por duplicado y se expresaron en mg/100 ml.

### 2.4.3. Valoración de los triglicéridos plasmáticos.

Los niveles circulantes de triglicéridos se determinaron mediante un método colorimétrico enzimático, utilizando el "kit" comercial "Triglycerides" (GPO-Trinder, 339-20, Sigma Diagnostics).

#### a) Base teórica del método.

En primer lugar, los triglicéridos son hidrolizados por una lipoproteína lipasa (LP) rindiendo glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es entonces fosforilado en presencia de ATP por la acción de la glicerol kinasa (GK), formándose glicerol-1-fosfato (G-1-P) y ADP. En una tercera reacción, catalizada por la glicerol fosfato oxidasa (GPO), el G-1-P se oxida a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno. Por último, el peróxido de hidrógeno, por acción de una peroxidasa (POD), reacciona con 4-aminoantipirina y N-etil-N-(3-sulfopropil)-m-anisidina sódica (ESPA) para formar una quinona coloreada, que presenta una absorbancia máxima a 540 nm. La absorbancia a 540 nm es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos de la muestra.



#### b) Reactivos.

- Solución reactiva:

• ATP	0,60 mmol/l
• Sal de magnesio	3 mmol/l
• 4-aminoantipirina	0,15 mmol/l
• N-etil-N-(3-sulfopropil)-m-anisidina sódica	1,69 mmol/l
• Lipasa (microbiana)	50000 U/l
• Glicerol kinasa (microbiana)	1000 U/l
• Glicerol fosfato oxidasa (microbiana)	2000 U/l
• Peroxidasa de rábano	2000 U/l
• Azida sódica	0,05 % p/v
• Tampón	pH 7 ± 0,1
• Estabilizantes	

#### **c) Procedimiento.**

- Reconstituir la solución reactiva en 20 ml de  $H_2O_d$  y conservarla a 37°C.
- Añadir 3 ml de solución reactiva a 10  $\mu$ l de muestra.
- Agitar por inversión e incubar a 37°C durante 5 min.
- Lectura de la absorbancia a 540 nm.
- Patrón de glicerol en el intervalo 3,125-500 mg/100 ml.

Las determinaciones se realizaron por duplicado y se expresan en mg/100 ml.

#### **2.4.4. Valoración del glucógeno.**

##### **a) Base teórica del método.**

La reactividad de los hidratos de carbono se debe fundamentalmente a los grupos funcionales carbonilo e hidroxilo. El calentamiento de los carbohidratos con ácido sulfúrico concentrado produce la deshidratación completa de estos compuestos, y por lo tanto su carbonización completa. Pero bajo condiciones más suaves, pentosas y hexosas se deshidratan parcialmente con pérdida de tres moléculas de agua, dando lugar a la formación de furfural o 5-hidroximetilfurfural. Ambos compuestos pueden condensarse con fenoles para formar sustancias coloreadas, que presentan un máximo de absorbancia a 487 nm, siendo la intensidad del color producido proporcional a la cantidad de glucógeno presente en la muestra.

##### **b) Reactivos.**

- KOH (30%): 30 g en 100 ml de  $H_2O_d$ .
- Ácido acético glacial.
- Etanol absoluto.
- TCA (20%): 20 g en 100 ml de  $H_2O_d$ .
- Solución de fenol: 80 g de fenol en 20 ml de  $H_2O_d$ .

##### **c) Procedimiento.**

- **Extracción.** (Cifonelli y cols., 1956; Montgomery, 1957).
- Añadir 1 ml de KOH a 20-40 mg de tejido.
- Llevar a ebullición durante 40 min.
- Neutralizar con 0,3 ml de ác. acético glacial.
- Añadir 2,6 ml de etanol al 96%.
- Calentar suavemente hasta provocar la precipitación.
- Centrifugar a 3.000 rpm durante 15 min.
- Decantar y lavar el precipitado con 4 ml de etanol absoluto.
- Repetir la serie centrifugación-decantación-lavado con 4 ml de éter.

- Centrifugar (3.000 rpm, 15 min) y decantar el sobrenadante.
- Secar el precipitado y disolver en KOH (20-30  $\mu$ l).
- Añadir 0,75 ml de  $H_2O_d$  y agitar hasta la completa disolución.
- Añadir 0,25 ml de TCA y mantener toda la noche en frío (4°C).
- Centrifugar a 5.000 rpm durante 15 min.
- Añadir 2 ml de  $H_2O_d$  a 0,5 ml del sobrenadante (solución problema).
- **Determinación espectrofotométrica.** (Dubois y cols., 1956).
  - Añadir 950  $\mu$ l de  $H_2O_d$  a 50  $\mu$ l de solución problema.
  - Añadir 25  $\mu$ l de solución de fenol y 2,5 ml de  $H_2SO_4$  concentrado.
  - Una vez frío, incubar a 25°C durante 15 min.
  - Lectura de la absorbancia a 487 nm.
  - Patrón de glucógeno hepático bovino (Sigma) en el intervalo 2,5-100  $\mu$ g.

Las determinaciones se realizaron por duplicado y los datos se expresan en  $\mu$ g glucógeno/ $\mu$ g proteína.

#### 2.4.5. Valoración de lípidos totales.

##### a) Base teórica del método.

La determinación de lípidos se realizó siguiendo el método descrito por Folch y colaboradores (1957). Este método consta de dos etapas sucesivas. En la primera, los lípidos se extraen por homogeneización del tejido en cloroformo-metanol y posterior filtrado. En la segunda fase se consigue la separación de la mayoría de los lípidos tisulares, por contacto de este filtrado con una solución salina. Se obtiene así un sistema bifásico, sin fluido interfásico, en el que las sustancias no lipídicas quedan en la fase superior acuosa, mientras que los lípidos quedan en la fase inferior.

##### b) Reactivos.

- Cloroformo-Metanol (2:1)
- Solución salina:
  - 0,039 g  $Cl_2Ca$
  - 0,052 g  $Cl_2Mg$
  - 0,58 g  $ClNa$
  - 100 ml  $H_2O_d$
- $Na_2SO_4$
- 1,4-Dioxano
- $H_2SO_4$

**c) Procedimiento.**

▪ **Extracción.**

- Añadir 0,4-0,8 ml de cloroformo-metanol a 20-40 mg de tejido.
- Filtrar el homogeneizado en filtro de papel con ayuda de cloroformo-metanol (el filtro debe estar empapado en cloroformo-metanol).
- Añadir solución salina (0,2 ml/ml de extracto) y agitar durante 1 min.
- Centrifugar 20 min a 2.400 rpm, y eliminar la fase superior. Lavar la superficie de la fase clorofórmica con la solución salina varias veces.
- Añadir  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  hasta que desaparezca la turbidez (toda la noche).
- Evaporar el disolvente en un evaporador-concentrador (Gyro-vap).
- Añadir 4 ml de dioxano al extracto seco de lípidos y llevar a ebullición hasta la disolución completa de los lípidos.
- Añadir 0,4 ml de dioxano a 0,2 ml del extracto lipídico obteniendo así la solución problema.

▪ **Determinación espectrofotométrica por turbidimetría.**

- Añadir 1,2 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,725 M) a 0,4 ml de solución problema.
- Lectura de la absorbancia a 505 nm.
- Curva patrón de trioleína (Sigma) en el intervalo 5-400  $\mu\text{g}$ .

Las determinaciones se efectuaron por duplicado y los datos se expresan en  $\mu\text{g}$  o ng lípidos/ $\mu\text{g}$  proteína.

**2.4.6. Determinación de proteínas totales.**

**a) Base teórica del método.**

Se utilizó el método descrito por Lowry y colaboradores (1951). Las proteínas reaccionan con cobre en solución alcalina. La reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdicofosfotungstico) por la oxidación de aminoácidos aromáticos catalizada por cobre rinde heteropolimolibdeno azul. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la concentración de proteínas en la muestra. La reacción es extremadamente dependiente del pH, que debe mantenerse entre 10-10,5.

**b) Reactivos.**

- Tartrato Na-K (2%): 2 g en 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .
- $\text{CuSO}_4$  (1%): 1 g en 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .
- Solución B: NaOH (1g) +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (5 g) en 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}_d$ .
- Solución C: 1 ml de  $\text{CuSO}_4$  (1%) + 1 ml de Tartrato Na-K (2%) en 100 ml de Solución B.
- Reactivo de Folin: Folin: $\text{H}_2\text{O}_d$  (1:1).

**c) Procedimiento.**

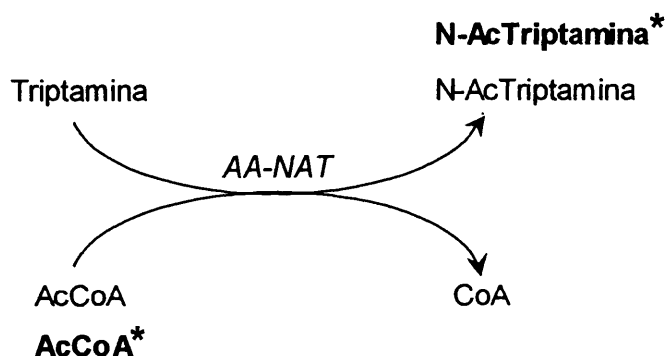
- Sonicar 10 mg de tejido en 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.
- Llevar 50 µl del homogeneizado a 0,5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (solución problema).
- Añadir 2,5 ml de solución C a 0,5 ml de solución problema.
- Agitar e incubar a 30°C durante 15 min.
- Añadir 0,25 ml de reactivo de Folin:H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (1:1).
- Agitar e incubar a 30°C durante 30 min.
- Lectura de la absorbancia a 500 nm.
- Patrón de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) en el intervalo 5-500 µg.

Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado y los datos obtenidos se expresan como µg proteína/mg tejido.

**2.5. TÉCNICAS RADIOENZIMÁTICAS.****2.5.1. Determinación de la actividad AA-NAT.****a) Principio del ensayo.**

La actividad serotonina N-acetiltransferasa (arilalquilamina, EC 2.3.1.87) se determinó según el método de radioenzim ensayo propuesto por Parfitt y colaboradores (1975) para la glándula pineal del hámster europeo (*Cricetus cricetus*) con modificaciones específicas para el tejido ocular puestas a punto por nuestro grupo de investigación (Alonso-Gómez y cols., 1992a).

Esta técnica se basa en la relación existente entre la actividad enzimática presente en una muestra y la cantidad de producto formado en el transcurso de la reacción. La actividad AA-NAT cataliza la transferencia de grupos acetilo desde el acetil-coenzima A (AcCoA) hasta la serotonina. En la reacción *in vitro* que tiene lugar en el ensayo la triptamina actúa como amina aceptora de los grupos acetilo, formándose N-acetiltriptamina. Partiendo de una mezcla de reacción en la que coexisten dos formas de AcCoA, una fría y una marcada radiactivamente (AcCoA\*), dado que la NAT tiene la misma afinidad por ambas, en el transcurso de la reacción se forman cantidades equivalentes de producto frío (N-AcTriptamina) y de producto marcado (N-AcTriptamina\*), por lo que la cantidad de radiactividad incorporada al producto es proporcional a la actividad AA-NAT presente en la muestra:



**b) Reactivos y tampones.**

- **Tampón fosfato 250 mM, pH = 6,5 (TP)**

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$             27,145 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$             8,725 g
- $\text{H}_2\text{O}$                 1000 ml

Ajustar con KOH 10% (p/v)

- **EGTA (20 mM) en TP (TPE)**

- EGTA    0,0761 g en 10 ml de TP.

Ajustar el pH a 6,5 con KOH 10% (p/v).

- **Solución madre de AcCoA 11 mM (mAc)**

- 10 mg AcCoA en 1ml de TP.
- Se hacen alícuotas de 20  $\mu\text{l}$  y se conservan congeladas a  $-20^\circ\text{C}$ .

- **Solución de AcCoA radiactiva 0,328 mM (mAc\*)**

- 100  $\mu\text{Ci}$  de [ $^{14}\text{C}$ -AcCoA] en 600  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_d$ .
- Se hacen alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  y se conservan congeladas a  $-20^\circ\text{C}$ .

- **Solución madre de triptamina 10 mM (mTr)**

- 3,93 mg de Triptamina-HCl en 2 ml de TP (se prepara inmediatamente antes del ensayo).

- **Solución de trabajo AcCoA y triptamina (ST)**

- [20  $\mu\text{l}$  mTr + 1  $\mu\text{l}$  mAc\*]/tubo.

- **Dilución de AcCoA (125  $\mu\text{M}$ )**

- [1  $\mu\text{l}$  mAc + 87  $\mu\text{l}$  TP]/tubo.

**c) Procedimiento experimental.**

- **Preparación del homogeneizado.**

Cada retina neural se sonica en frío en 300  $\mu\text{l}$  de TPE (2 pulsos de 5 sg a una potencia de 60 %). Una vez sonicadas, el homogeneizado se centrifuga a 6.000 rpm



durante 1 min para que sedimenten los gránulos de pigmento procedentes de restos del epitelio pigmentado que hayan podido quedar adheridos a la retina.

**- Radioenzimoensayo.**

- A cada tubo del ensayo se le añade, en este orden:

Homogeneizado	100 µl
AcCoA (125 µM)	80 µl
ST	20 µl

Las concentraciones finales en la mezcla de reacción son 50 µM de AcCoA y 1 mM de triptamina. La mezcla de reacción se prepara en baño de hielo.

- Los tubos blanco se realizan sustituyendo el homogeneizado de tejido por 100 µl de TPE.
  - Incubación a 25°C durante 20 min.
  - Parar la reacción añadiendo 1 ml de cloroformo frío.
  - Agitar 3 veces (20 sg cada vez).
  - Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min.
  - Eliminar el sobrenadante por aspiración.
  - Añadir 200 µl de TP y agitar 2 veces (10 sg cada vez).
  - Centrifugar a 6.000 rpm durante 1 min. Aspirar el sobrenadante (2 lavados).
  - Recoger 0,5 ml de la fase clorofórmica en un tubo Eppendorf.
  - Dejar evaporar. Añadir 0,5 ml de líquido de centelleo.
  - Contaje de la radiactividad durante 5 min (contador β).

**d) Cálculo de los resultados.**

La actividad enzimática se calcula a partir de las cpm del extracto clorofórmico de la mezcla de reacción. Dado que la estequiometría de la reacción catalizada por la NAT es 1:1, por cada molécula de AcCoA consumida se forma una de N-AcTriptamina y, por tanto, la cantidad de N-AcTriptamina\* formada es la misma que la cantidad de AcCoA\* consumida. Al inicio de la reacción hay una cantidad (nmoles) conocida de AcCoA total (marcada más fría) que corresponde a las cpm totales (que vienen dadas por la AcCoA\* añadida), de modo que conocidas las cpm del extracto tras la reacción, podemos calcular los nanomoles transformados:

$$\text{NAT (nmol/tubo)} = \frac{\text{cpm (muestra)} - \text{cpm (blanco)}}{\text{cpm (totales)}} \times \text{nmol iniciales AcCoA} \times 2$$

El resultado obtenido debe ser multiplicado por 2 puesto que sólo se valoran las cpm en la mitad del total de extracto clorofórmico (0,5 ml).

Para expresar los resultados en nmoles de producto formado por hora y por mg de proteína se debe hacer la siguiente corrección:

$$\text{NAT (nmol/h/mg prot)} = \frac{\text{NAT (nmol/tubo)}}{\text{tiempo de reacción (h)} \times \text{mg prot/tubo}}$$

Para la determinación del contenido de proteínas en la retina de la tenca se realizaron algunas modificaciones respecto al protocolo descrito en el apartado 2.4.6. La solución problema se obtuvo a partir de 15 µl de homogeneizado y 235 µl de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y el volumen de solución C y de reactivo de Folin añadido a cada tubo se redujo a la mitad respecto al protocolo general (es decir, 1,25 ml y 125 µl, respectivamente). Esta determinación se llevó a cabo por duplicado.

## 2.6. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS (CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN, HPLC).

### 2.6.1. Principios generales del ensayo.

La cromatografía líquida es una técnica idónea para el análisis de moléculas de peso molecular inferior a 1000 Da. Durante el proceso cromatográfico se genera un conjunto de fuerzas que compiten de manera selectiva por un compuesto, bien tendiendo a fijarlo a la fase estacionaria de la columna, o bien a arrastrarlo con la fase móvil que la atraviesa. El tipo de estas fuerzas va a depender de la naturaleza de la muestra, de la fase estacionaria y de la fase móvil. Las moléculas quedarán más o menos retenidas en la fase estacionaria dependiendo de si la fuerza de retención es mayor o menor que la fuerza que las mantiene en la fase móvil (fuerza de disolución), presentando un "tiempo de retención" (*t<sub>r</sub>*) característico para cada molécula y dependiente de las características estructurales de cada compuesto (peso molecular, carga iónica, grupos funcionales, etc) (García de Marina y Del Castillo, 1988).

Existen distintos tipos de cromatografía líquida dependiendo del modo de separación de los compuestos. Uno de estos tipos es la cromatografía de fase reversa, que corresponde al utilizado en este trabajo. Los compuestos a analizar se reparten entre una fase estacionaria hidrofóbica y una fase móvil acuosa. La fase estacionaria, empaquetada en la columna, está constituida por grupos octadecilo (ODS) anclados a una superficie inerte de sílice. La retención del soluto se produce por interacciones

hidrofóbicas entre éste y la fase estacionaria hidrocarbonada. Para la elución de las moléculas a determinar se utilizan fases móviles polares, generalmente agua conteniendo metanol, acetonitrilo u otros disolventes orgánicos, produciéndose la elución en orden de polaridad decreciente, es decir, eluirán primero los compuestos más hidrofílicos. Además, la cromatografía de par iónico implica la presencia en la fase móvil de un compuesto, generalmente de naturaleza orgánica y de elevado peso molecular como el octanosulfonato sódico, con iones de carga opuesta a la de la muestra problema (en nuestro caso monoaminas, que presentan carga positiva a pH 2-8). Se formará así un par iónico con la muestra, neutralizándose su carga y, permitiendo de este modo su solubilización en la fase orgánica estacionaria. Además, se aumenta el tiempo de retención de las catecolaminas, evitando su elución en el frente de inyección.

La detección electroquímica (ED) implica el uso de un potencial eléctrico para efectuar una reacción química. En el caso de las monoaminas, los grupos hidroxilo pueden oxidarse aplicando al electrodo un potencial positivo, con la consiguiente formación de ortoquinonas, liberando dos electrones y dos protones. La detección electroquímica de melatonina proporciona mayor sensibilidad que la detección ultravioleta o la detección fluorimétrica, llegando a ser comparable a la obtenida mediante el RIA o la espectrometría de masas (Vieira y cols., 1992). Dentro de la detección electroquímica, en la coulométrica, utilizada en la presente Memoria, el 100% de las moléculas son oxidadas, por lo que la señal generada es directamente proporcional a la cantidad total de moléculas que se pueden medir (ESA Inc., 1992).

#### **2.6.2. Cuantificación de melatonina mediante HPLC-ED.**

El contenido de melatonina se cuantificó según el método desarrollado por Vieira y colaboradores (1992) para la glándula pineal y el plasma de mamíferos, con modificaciones específicas para el tejido ocular puestas a punto por nuestro grupo de investigación (Valenciano, 1998). Este método proporciona una elevada sensibilidad, precisión y reproducibilidad.

##### **a) Preparación de la fase móvil.**

La fase móvil utilizada está constituida por:

- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (25 mM)	4,45 g/l
- H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% (25 mM)	1,7 ml/l
- Acetonitrilo (20%)	200 ml/l

Disolver el Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y el H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en agua de calidad MiliQ y ajustar el pH a 3,5 con NaOH 5 N. Enrasar el volumen final y añadir el acetonitrilo.

Previamente a su utilización, la fase móvil es filtrada a través de filtros de poliamida (Sartorius 0,45 µm, Sartolon) y desgasificada con helio durante 15-20 minutos.

#### **b) Preparación de las soluciones estándares.**

Las soluciones madre de melatonina y de los estándares internos (2-l-melatonina y 6-Cl-melatonina) se preparan en etanol absoluto a una concentración de 5 mM y se conservan a -80°C.

A partir de las soluciones madres de 2-l-mel y 6-Cl-mel se obtiene, por diluciones sucesivas en fase móvil, una solución conteniendo ambos estándares a una concentración final de 10 nM. Con esta solución se realizan diluciones sucesivas de la solución madre de melatonina hasta obtener la curva de calibración en el intervalo 1,25-10 nM.

#### **c) Preparación de las muestras.**

##### **- Homogeneización.**

Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 6,5.

- H<sub>2</sub>O<sub>ddd</sub> 100 ml

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,20 g

Ajustar el pH a 6,5 con NaOH al 10% (p/v).

Sonicar cada retina en 300 µl de tampón fosfato sódico. Reservar 20 µl del homogeneizado para la determinación de las proteínas. A los 280 µl restantes de homogeneizado se añaden 100 µl de una mezcla de estándares internos a una concentración de 10 nM. Para la determinación de las proteínas, que se realiza por duplicado, se añaden 240 µl de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> a los 10 µl de homogeneizado. El resto del ensayo se realizó según lo descrito en el apartado 2.4.6.

##### **- Extracción.**

- Añadir 3 ml de cloroformo al homogeneizado (380 µl). Agitar y centrifugar a 1.000 g durante 5 min.
- Eliminar el sobrenadante por aspiración.
- Secar la fase clorofórmica bajo atmósfera de nitrógeno.
- Reconstituir con 100 µl de fase móvil y 2 ml de pentano. Agitar y centrifugar a 1.000 g durante 5 min.
- Eliminar el pentano por aspiración secando los restos de pentano bajo atmósfera de nitrógeno.

#### **d) Instrumental y condiciones cromatográficas.**

- Bomba peristáltica (Waters 590). Flujo 1 ml/min.

- Inyector manual Reodine (puerto de inyección de 20 µl).
- Columna C8 (Spherisorb, Tracer). Tamaño de partícula: 3 µm. Diámetro interno: 0,46 cm. Longitud: 10 cm.
- Célula de acondicionamiento (ESA, 5021).
- Célula analítica:
  - Electrodo 1: Potencial: 100 mV; Sensibilidad: 20 nA.
  - Electrodo 2: Potencial: 600 mV; Sensibilidad: 50 nA.
- Módulo de control: Coulochem II (ESA).
- Sistema de software: Biocrom 2000 (Micron Analítica S.A.) para la transformación de la señal analógica a digital y posterior análisis matemático.

Previamente a la inyección de las muestras se procede a la calibración del sistema dos veces al día inyectando una solución que contiene una cantidad conocida de melatonina y de los metoxindoles no fisiológicos que actúan como estándares internos (2-l-melatonina y 6- Cl-melatonina). La calibración permite conocer:

- El tiempo de retención de la melatonina y de los estándares internos.
- Las posibles pérdidas de melatonina durante el almacenamiento y procesamiento de las muestras, gracias a la obtención de un factor de respuesta ( $f_R$ ) respecto al estándar interno.
- Las variaciones de sensibilidad del detector.

#### e) Cálculo de los resultados.

Las áreas obtenidas tras la integración de los picos del cromatograma fueron transformadas en pmol/ml aplicando la siguiente fórmula):

$$\text{pmol/ml} = \frac{(A_c \times f_R)}{P}$$

donde:

- $A_c$ : área del compuesto en la muestra.
- $f_R$ : factor de recuperación =  $\frac{\text{área media del estándar interno}}{\text{área del estándar interno en la muestra}}$
- $P$ : pendiente de la recta de regresión estándar.

Finalmente, los datos obtenidos se expresan como pg/mg prot:

$$\text{Mel (pg/mg prot)} = \frac{(\text{pmol/ml}) \times V_m \times P_m}{\text{mg prot}}$$

donde:

- $V_m$ : Volumen de muestra (ml).
- $P_m$ : peso molecular (Da).

### 2.6.3. Cuantificación de monoaminas hipotalámicas y sus metabolitos mediante HPLC-ED.

#### a) Preparación de la fase móvil.

La fase móvil utilizada está constituida por:

- EDTA-Na (0,1 mM)	37,2 mg/l
- $H_3PO_4$ 85% (10 mM)	0,68 ml/l
- Ácido 1-octanosulfónico (0,4 mM)	86,5 mg/l
- Acetonitrilo (3,5%)	35 ml/l

Disolver el EDTA-Na, el octanosulfonato sódico y el  $H_3PO_4$  en agua de calidad MiliQ y ajustar el pH a 2,84 con NaOH 10 N. Ajustar el volumen final y finalmente añadir el acetonitrilo.

Previamente a su utilización, la fase móvil es filtrada a través de filtros de poliamida (Sartorius 0,45  $\mu m$ , Sartolon) y desgasificada con helio durante 15-20 minutos.

#### b) Preparación de las soluciones estándares.

Las soluciones madre de las distintas monoaminas y del estándar interno (isoproterenol) se preparan en solución de ácido perclórico (PCA) a una concentración 10 mM y se conservan a  $-80^\circ C$ . Esta solución de PCA consta de:

- PCA (0,2 N)	2,174 ml/100 ml
- Bisulfito sódico (0,2 mM)	3,802 mg/100 ml
- EDTA-Na (0,4 mM)	14,88 mg/100 ml

Disolver en primer lugar el EDTA-Na y el bisulfito sódico en agua de calidad MiliQ y posteriormente añadir el PCA.

A partir de la solución madre de isoproterenol 10 mM se obtuvo, por diluciones sucesivas en solución de PCA, una solución de homogeneización conteniendo dicho estándar a una concentración 100 nM. Con esta solución de homogeneización se realizaron diluciones sucesivas de las soluciones madre de monoaminas hasta obtener la curva de calibración en el intervalo 3,125-300 nM.

#### c) Preparación de las muestras.

- Sonicar medio hipotálamo en 100  $\mu l$  de solución de homogeneización en frío (2 pulsos de 5 segundos a una potencia de 60%).

- Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
- Inyectar el sobrenadante en el sistema de HPLC y conservar el precipitado para la determinación de proteínas.

**d) Instrumental y condiciones cromatográficas.**

- Bomba peristáltica (Waters 590). Flujo 1 ml/min.
- Inyector automático (Agilent 1100 series, modelo G 1329A ALS) acoplado a un termostatizador (Agilent, modelo G 1330BA ALSTherm).
- Columna C18 (Spherisob, Waters). Tamaño de partícula: 5 µm. Diámetro interno: 0,46 cm. Longitud: 12,5 cm.
- Célula de acondicionamiento (ESA, 5021).
- Célula analítica:
  - Electrodo 1: Potencial: 50 mV; Sensibilidad: 20 nA.
  - Electrodo 2: Potencial: 300 mV; Sensibilidad: 10 nA.
- Módulo de control: Coulochem II (ESA).
- Sistema de software: Biocrom XP (Micron Analítica S.A.) para la transformación de la señal analógica a digital y posterior análisis matemático.

Previamente a la inyección de las muestras se procede a la calibración del sistema varias veces al día inyectando una solución que contiene una cantidad conocida de las diferentes aminas que van a ser medidas así como de la amina no fisiológica que se utiliza como estándar interno (isoproterenol).

**e) Cálculo de los resultados.**

Las áreas obtenidas tras la integración de los picos del cromatograma fueron transformadas en nmol/ml aplicando la siguiente fórmula):

$$\text{nmol/ml} = \frac{(A_c \times f_R)}{P} \times 2$$

donde:

- $A_c$ : área del compuesto en la muestra.
- $f_R$ : factor de recuperación =  $\frac{\text{área media del estándar interno}}{\text{área del estándar interno en la muestra}}$
- P: pendiente de la recta de regresión estándar.

Finalmente, los datos obtenidos se expresan como ng/mg prot o pg/mg prot:

$$\text{ng/mg prot} = \frac{(\text{nmol/ml}) \times V_m \times P_m}{\text{mg prot}}$$

donde:

- $V_m$ : Volumen de muestra (ml).
- $P_m$ : peso molecular (Da).

Para la determinación del contenido de proteínas en el hipotálamo se reconstituyó el precipitado en 120  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_d$  y la solución problema se obtuvo a partir de 20  $\mu\text{l}$  de homogeneizado y 480  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_d$ . Esta determinación de proteínas se realizó por duplicado.

Este método de HPLC utilizado en la presente memoria ha sido validado previamente para la cuantificación de monoaminas encefálicas de *C. auratus* por nuestro grupo de investigación (De Pedro y cols., 2001a).

## 2.7. TÉCNICAS RADIOINMUNOLÓGICAS (RIA).

### 2.7.1. Criterios de validez del RIA (Midgley y cols., 1969).

#### a) Especificidad.

Es la capacidad del anticuerpo de discernir selectivamente entre varios compuestos químicos relacionados con la hormona a valorar, y que podrían existir en las muestras biológicas. Se calcula como los coeficientes de reacción cruzada, que representan la relación, en porcentaje, entre las concentraciones de hormona y el compuesto similar necesario para obtener un desplazamiento del 50% de una cantidad conocida de marcador.

#### b) Paralelismo.

Entre la curva estándar y una serie de diluciones de la muestra. Este método de validación es utilizado como un índice de similitud de la inmunoreactividad entre el compuesto estándar y el valorado en la muestra. La existencia de paralelismo indica que el factor de dilución utilizado no afecta a la estimación de la concentración final de hormona.

#### c) Recuperación analítica.

Se define como la diferencia, en tanto por ciento, entre el valor estimado mediante RIA y la cantidad real de hormona añadida. En el caso de realizarse utilizando varias



concentraciones de hormona, debe establecerse una correlación lineal entre la cantidad real y la estimada.

**d) Sensibilidad.**

Se define como la menor concentración de hormona que puede ser discriminada de la unión máxima ( $B_0$ ) con una  $p < 0,05$ . La sensibilidad se calcula como el punto que dista del  $B_0$  dos veces su desviación estándar.

**e) Precisión y reproducibilidad.**

Se mide utilizando los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo determinados a varias concentraciones de la curva estándar. Los coeficientes de variación representan la relación, en tanto por ciento, entre la desviación típica y la media. Dichos coeficientes son un índice de la reproducibilidad del método bajo las condiciones de ensayo utilizadas y deben ser siempre inferiores a la variabilidad encontrada en las muestras biológicas.

$$\text{Coeficiente de variación} = \frac{\text{Desviación estándar de la media}}{\text{Media}} \times 100$$

**2.7.2. Principios generales del ensayo.**

El radioinmunoensayo se basa en la competición que se establece entre un compuesto marcado radiactivamente, en nuestro caso con  $^{125}\text{I}$ , y el mismo compuesto “frío” (bien el estándar o bien el compuesto presente en la muestra) por unirse a una cantidad limitada de anticuerpo específico (anticuerpo primario) para ese compuesto. Con la ayuda de un segundo anticuerpo (anticuerpo secundario) específico para el anticuerpo primario se consigue la precipitación de los complejos anticuerpo-antígeno “frío” y anticuerpo-antígeno marcado y por lo tanto la separación del  $^{125}\text{I}$ -antígeno unido al anticuerpo del antígeno marcado libre. Al aumentar la concentración de compuesto “frío”, la cantidad de compuesto marcado capaz de unirse al anticuerpo disminuye, por lo que la cantidad de marcaje final será inversamente proporcional a la cantidad de compuesto “frío” presente en la muestra problema. Midiendo la cantidad de compuesto marcado que se une al anticuerpo en presencia de concentraciones crecientes y conocidas del estándar se puede construir una curva estándar a partir de la cual determinar la concentración de compuesto frío presente en la muestra.

### **2.7.3. Determinación del contenido encefálico de NPY y de los niveles plasmáticos de ghrelina.**

La determinación del contenido de NPY en hipotálamo y telencéfalo y de los niveles circulantes de ghrelina se realizó por radioinmunoensayo utilizando los “kits” comerciales “Neuropeptide Y RIA” (Human, Rat) (S-2029, Bachem, Peninsula Laboratories, Inc.) y “Ghrelina RIA” (Human) (S-2227, Bachem, Peninsula Laboratories, Inc.), respectivamente.

#### **a) Reactivos de los “kits” comerciales.**

- Tampón
- Péptido estándar: NPY o ghrelina (líoofilizado, 12,8 µg)
- Anticuerpo primario de conejo
- <sup>125</sup>I-Péptido: NPY o ghrelina (líoofilizado, 1,5 µCi)
- Anticuerpo secundario de conejo (GARGG) (líoofilizado)
- Suero de conejo (NRS) (líoofilizado)

#### **b) Preparación de las muestras de hipotálamo y telencéfalo.**

- Poner las muestras en baño de agua a 100°C durante 10 minutos.
- Sonicar (2 ciclos: 0,5, amplitud 60%).
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 3 minutos.
- Conservar el sobrenadante a -80°C para determinar el contenido de NPY. El análisis se realiza en muestras diluidas (1/20). Las diluciones se realizaron con el tampón incluido en el “kit”. Los datos se expresaron como ng/hipotálamo y ng/telencéfalo.

#### **c) Procedimiento.**

##### **• Día 1**

- Diluir el tampón con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> hasta un volumen final de 200 ml.
- Reconstituir el péptido estándar con 1 ml de tampón.
- Reconstituir el anticuerpo primario con 13 ml de tampón.
- Diluir las muestras con tampón (dilución 1/20).
- Preparar una serie de diluciones del estándar para obtener una curva con concentraciones desde 1 pg/tubo hasta 128 pg/tubo.
- Añadir 100 µl de tampón a los tubos NSB (unión no específica) (por triplicado).
- Añadir 50 µl de tampón a los tubos B<sub>0</sub> (unión máxima) (por triplicado).
- Añadir 50 µl de cada una de las concentraciones del estándar a los tubos de la curva (por triplicado).
- Añadir 50 µl de muestra a los tubos de la muestra (por duplicado).
- Añadir 50 µl de anticuerpo primario a todos los tubos excepto a los tubos T (cuentas totales) y a los NSB.

- Agitar e incubar a 4°C durante 24 h.

• **Día 2**

- Preparación del péptido marcado: Diluir el péptido marcado con 1 ml de tampón (solución madre). Dependiendo de la eficiencia del contador gamma utilizado la cantidad de solución madre a utilizar varía. Para determinar esta cantidad se miden las cuentas en 5 µl de solución madre y se aplica la siguiente fórmula:

$$X \mu\text{l} = \frac{5 \mu\text{l (solución madre)} \times \text{cpm deseadas} \times (\text{n}^\circ \text{ tubos} + 10)}{\text{cpm en } 5 \mu\text{l de la solución madre}}$$

$$Y \text{ ml} = (0,05 \text{ ml} \times (\text{n}^\circ \text{ tubos} + 10)) - X$$

donde:

- X: µl de solución "madre"
- Y: ml de tampón
- Combinar X µl de <sup>125</sup>I-péptido con Y ml de tampón. Mezclar bien y contabilizar las cpm en 50 µl de esta solución. El intervalo de cpm para 50 µl debe estar entre 5.000 y 7.500. Si fuese necesario, ajustar la concentración de <sup>125</sup>I-péptido hasta lograr las cpm deseadas.
- Añadir 50 µl de la solución así obtenida a todos los tubos.
- Agitar e incubar a 4°C durante 18 h.

• **Día 3**

- Reconstituir el GARGG y el NSR con 13 ml de tampón, respectivamente.
- Añadir 50 µl de GARGG a todos los tubos, excepto a los tubos de cpm totales (T).
- Añadir 50 µl de NSR a todos los tubos, excepto a los tubos T.
- Agitar e incubar a temperatura ambiente durante 2 h.
- Añadir 250 µl de tampón a todos los tubos, excepto a los tubos T.
- Agitar y centrifugar a 4.000 rpm a 4°C durante 20 min todos los tubos, excepto los tubos T.
- Aspirar el sobrenadante (no aspirar los tubos T).
- Medir las cpm en el precipitado en un contador gamma durante 2 min.

En la Tabla 1 se resumen los volúmenes de tampón, muestra/estándar, péptido marcado, anticuerpo primario y secundario y suero que hay que añadir a cada tipo de tubo.

**Tabla 1.** Resumen de los volúmenes a añadir de cada uno de los elementos del radioinmunoensayo para NPY o ghrelina a los distintos tipos de tubos.

	Tampón	St	Muestra	Ac 1°	<sup>125</sup> I-Péptido	GARGG	NSR	Tampón
T	---	---	---	---	50 µl	---	---	---
NSB	100 µl	---	---	---	50 µl	50 µl	50 µl	250 µl
B <sub>0</sub>	50 µl	---	---	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	250 µl
St	---	50 µl	---	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	250 µl
Muestra	---	---	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	250 µl
	Día 1				Día 2	Día 3		

T: cpm totales de la dilución de la solución madre del péptido marcado; NSB: unión no específica; B<sub>0</sub>: unión máxima; St: estándar; GARGG: anticuerpo secundario; NSR: suero de conejo.

#### 2.7.4. Determinación de los niveles circulantes de leptina.

La valoración de los niveles circulantes de leptina se realizó por radioinmunoensayo utilizando el “kit” comercial “Leptin Multi-species” (71430, Linco Research Inc.)

##### a) Reactivos del “kit” comercial.

- Tampón
- Anticuerpo de cobaya para leptina de diferentes especies
- <sup>125</sup>I-leptina humana (liofilizada, < 3 µCi)
- Tampón
- Péptido estándar (leptina humana recombinante, 1-50 ng/ml)
- Controles de calidad (3 y 22 ng/ml)
- Reactivo precipitante

##### b) Procedimiento.

###### • Día 1

- Añadir 150 µl de tampón a los tubos NSB (unión no específica) (por triplicado).
- Añadir 100 µl de tampón a los tubos B<sub>0</sub> (unión máxima) (por triplicado).
- Añadir 50 µl de tampón a los tubos de los estándares (por triplicado), a los de los controles de calidad (por duplicado) y a los de las muestras (por duplicado).
- Añadir 50 µl de cada una de las concentraciones del estándar a los tubos correspondientes de la curva.

- Añadir 50 µl de cada concentración de los controles de calidad.
- Añadir 50 µl de muestra (plasma) a los tubos de la muestra.
- Añadir 50 µl de anticuerpo primario a todos los tubos excepto a los tubos T (cuentas totales) y a los NSB.
- Agitar e incubar a 4°C durante 20-24 h.

• **Día 2**

- Reconstituir el péptido marcado con los 27 ml de tampón. Dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos agitando ocasionalmente.
- Añadir 50 µl de la dilución de  $^{125}$ I-leptina a todos los tubos.
- Agitar e incubar a 4°C durante 20-24 h.

• **Día 3**

- Añadir 500 µl de reactivo precipitante a todos los tubos excepto a los tubos T.
- Agitar e incubar a 4°C durante 20 min.
- Centrifugar todos los tubos, excepto los tubos T, a 2.000-3.000 g durante 20 min.
- Decantar inmediatamente el sobrenadante de todos los tubos, excepto los tubos T.
- Medir las cpm del precipitado en un contador gamma durante 2 min.

En la Tabla 2 se resumen los volúmenes de tampón, muestra/control/estándar, péptido marcado y anticuerpo primario y reactivo precipitante que hay que añadir a cada tipo de tubo.

**Tabla 2.** Resumen de los volúmenes a añadir de cada uno de los componentes del "kit" para leptina a los distintos tipos de tubos.

	Tampón	St	Control	Muestra	Antic 1º	$^{125}$ I-leptina	Reactivo precipitante.
T	---	---	---	---	---	50 µl	---
NSB	150 µl	---	---	---	---	50 µl	500 µl
B <sub>0</sub>	100 µl	---	---	---	50 µl	50 µl	500 µl
St	50 µl	50 µl	---	---	50 µl	50 µl	500 µl
Control	50 µl	---	50 µl	---	50 µl	50 µl	500 µl
Muestra	50 µl	---	---	50 µl	50 µl	50 µl	500 µl
	Día 1					Día 2	Día 3

T: cpm totales de la dilución de  $^{125}$ I-leptina; NSB: unión no específica; B<sub>0</sub>: unión máxima; St: estándar.

## 2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

El valor de las variables estudiadas se ha expresado mediante un parámetro de centralización (media aritmética) y uno de dispersión (error estándar de la media, e.e.m.). Para realizar el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa informático Sigma Stat 3.2.

### 2.8.1. Análisis de regresión lineal.

El análisis de regresión indica si una variable,  $y$ , que se define por la función " $y = a + bx$ ", depende de una variable independiente,  $x$ , lo que viene dado por el *coeficiente de correlación "r"* (Sokal y Rohlf, 1979). Permite, por tanto, estudiar la posible relación entre pares de valores obtenidos de los mismos animales.

### 2.8.2. Análisis de la varianza (ANOVA) y test de comparaciones múltiples.

Cuando el número de medias muestrales a comparar fue mayor de dos, pero el criterio de clasificación de las mismas fue único, es decir, existía un único factor o fuente de variación, se utilizó el ANOVA de una vía. En los casos en que este análisis resultó significativo se aplicó posteriormente un test de comparaciones múltiples, concretamente el test de Student-Newman-Keuls (SNK), que permite determinar los pares de muestras que presentan diferencias significativas.

En aquellas variables que presentaron una gran dispersión de su varianza, se realizó la transformación logarítmica de sus valores con el objeto de conseguir la homogeneidad de dichas varianzas, comprobándose a continuación la homocedasticidad mediante la aplicación del test de Barlett (Sokal y Rohlf, 1979).

### 2.8.3. Análisis sinusoidal.

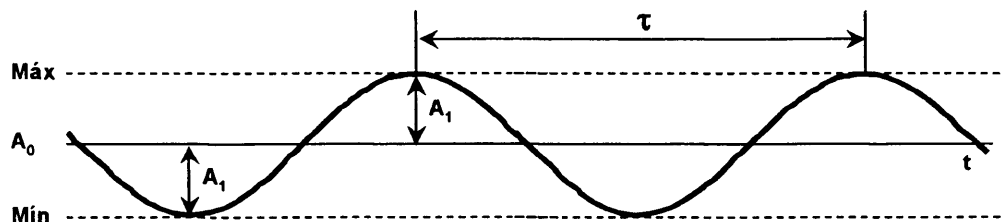
La ritmicidad de los distintos parámetros estudiados se ajustó a funciones cíclicas de tipo sinusoidal. Se utilizó el método de Duggleby (1981) para ajustar los datos experimentales al modelo:

$$y = A_0 + A_1 \times \cos (t \times \pi/12 \varphi)$$

Los parámetros estimados fueron (Esquema 13):

- $A_0$ : Nivel medio o méso. Indica la media de los datos ajustados al ritmo sinusoidal.
- $A_1$ : Amplitud sinusoidal. Indica la oscilación de la función sinusoidal a partir del valor  $A_0$ .
- $\varphi$ : Fase. Indica el desplazamiento de la curva sinusoidal respecto al origen. Su valor coincide con el momento del máximo.

- t: Tiempo. Se representa en horas y debe ser transformado a radianes para introducirlo en el modelo. El periodo de la curva sinusoidal, en nuestro caso, toma el valor de 24 h ( $24 \text{ h} = 2 \pi \text{ radianes}$ ).



**Esquema 13.** Parámetros que caracterizan un ritmo:  $A_0$ : nivel medio o mesor;  $A_1$ : amplitud sinusoidal;  $\tau$ : periodo; t: tiempo; Máx: máximo; Mín: mínimo.

Para determinar si el ritmo es significativo se utilizó la razón ruido/señal de la  $A_1$  como estadístico. Cuando este parámetro es menor de 0,3 se acepta que el ritmo es significativo (Halberg y Reinberg, 1967). El coeficiente ruido/señal se calculó como:

$$\frac{\text{ruido}}{\text{señal}} = \text{error estándar de } A_1/A_1$$

#### 2.8.4. Test $t$ de Student.

Este test se aplicó para comparar la pendiente de dos rectas a partir de los datos obtenidos en el análisis de regresión lineal (pendiente y error estándar de ésta).

#### 2.8.5. Grados de significación.

Los grados de significación considerados en la presente Memoria han sido los siguientes:

N.S.	$p > 0,05$
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$

## 2.9. DISEÑOS EXPERIMENTALES.

### 2.9.1. Variaciones diarias y estacionales en la hematología, bioquímica plasmática y reservas metabólicas en *Tinca tinca*.

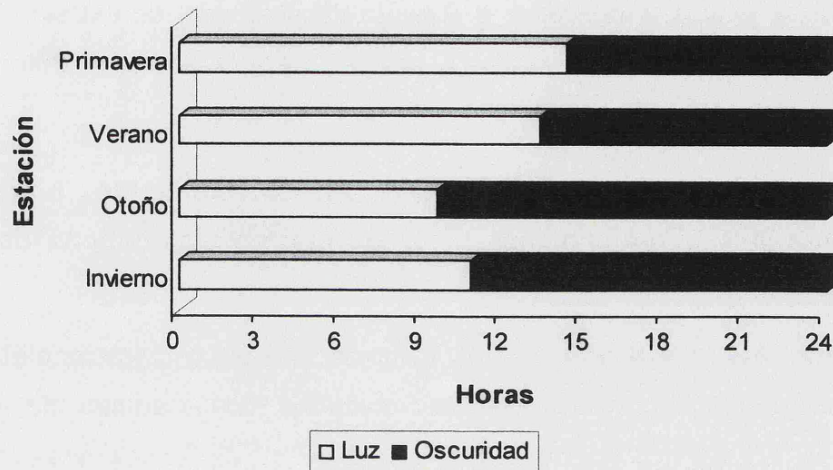
Con el propósito de estudiar las posibles variaciones diarias y estacionales en la hematología, bioquímica plasmática y reservas metabólicas en esta especie de teleosteo se aclimataron tencas adultas de ambos sexos (hembras:  $108,9 \pm 2,9$  g y machos:  $94,9 \pm 2,4$  g) a condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura en las cuatro estaciones del año. Para ello, los peces se mantuvieron durante 3-4 semanas en tanques de 5 m<sup>3</sup> provistos de un sistema de renovación continua de agua. Los muestreos ( $n = 64$ /estación) se realizaron en primavera (14-5-98), verano (25-8-98), otoño (26-11-98) e invierno (19-2-99). En cada ciclo diario de 24 horas las tencas se sacrificaron cada 3 horas con el siguiente horario de muestreo: 11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00, 2:00, 5:00, 8:00 ( $n = 8$ /grupo). El fotoperiodo (L:D), las horas de salida y puesta del sol y la temperatura (máxima-mínima) del agua se resumen en la Tabla 3 y en el Esquema 14.

**Tabla 3.** Fotoperiodo diario, hora de salida y puesta de sol y temperatura del agua y ambiental en las cuatro estaciones del año.

				Tª agua		Tª ambiental				
						Día de muestreo		Mensual		
Estación	Fotoperiodo	Orto	Ocaso	mín.	máx.	mín.	máx.	mín.	máx.	media
Primavera	14,4L:9,6D	7:00	21:23	15	18	10,4	19,6	10,4	21,2	15,8
Verano	13,4L:10,6D	7:35	20:58	22	26	22,6	37,0	19,3	33,9	26,6
Otoño	9,6L:14,4D	8:13	17:51	12	15	2,6	14,0	5,1	14,9	10,0
Invierno	10,8L:13,2D	8:04	18:54	5	8	0,6	18,4	1,0	13,4	7,5

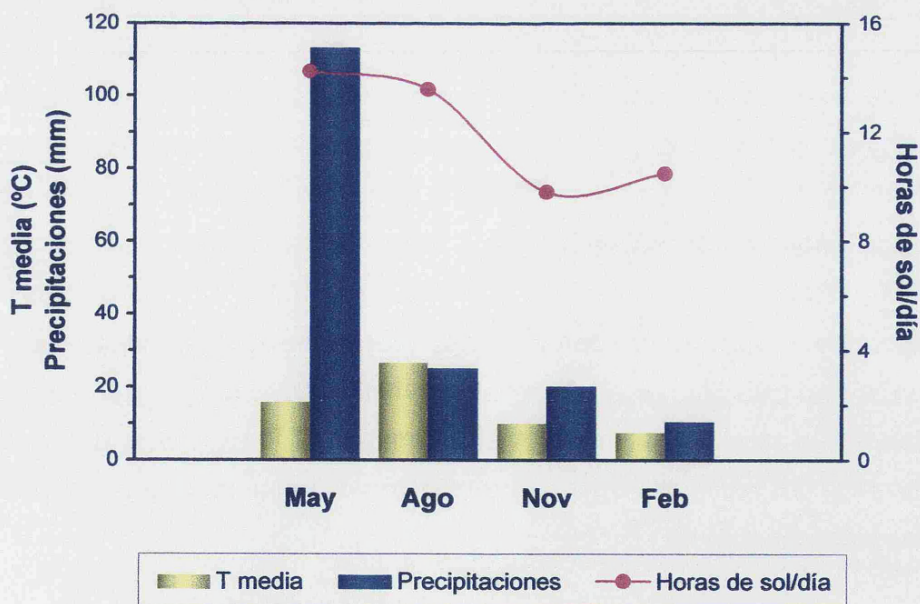
L: horas de luz; D: horas de oscuridad; Tª agua: Temperatura del agua (°C); Tª ambiental: Temperatura ambiental (°C). (Fuente de información: Observatorio Astronómico Nacional, Instituto Geográfico Nacional, Ministerio de Fomento y Dirección General del Instituto Nacional de Meteorología).





**Esquema 14.** Fotoperíodos correspondientes a los días en que se realizaron los muestreos en cada una de las estaciones del año.

En el Esquema 15 se muestran las temperaturas medias, la precipitación total y el promedio de horas de sol/día mensuales en los meses en los que se realizó el estudio.



**Esquema 15.** Temperaturas medias (°C), precipitación total (mm) y promedio de horas de sol mensuales desde febrero de 1998 hasta febrero de 1999 en Madrid. (Fuente de información: Observatorio Astronómico Nacional, Instituto Geográfico Nacional, Ministerio de Fomento y Dirección General del Instituto Nacional de Meteorología).

Antes de ser sacrificadas, se determinaron el peso corporal y la longitud de las tencas, y se extrajeron muestras de sangre para el estudio de los distintos parámetros hematológicos (número total de eritrocitos y leucocitos, recuento diferencial de leucocitos,

hematocrito y concentración de hemoglobina) y bioquímica del plasma (colesterol, glucosa, proteínas totales y triglicéridos). Tras la decapitación, se extrajo el hígado, las gónadas y muestras de músculo (dorsal y ventral) para la posterior determinación de glucógeno, lípidos y proteínas totales.

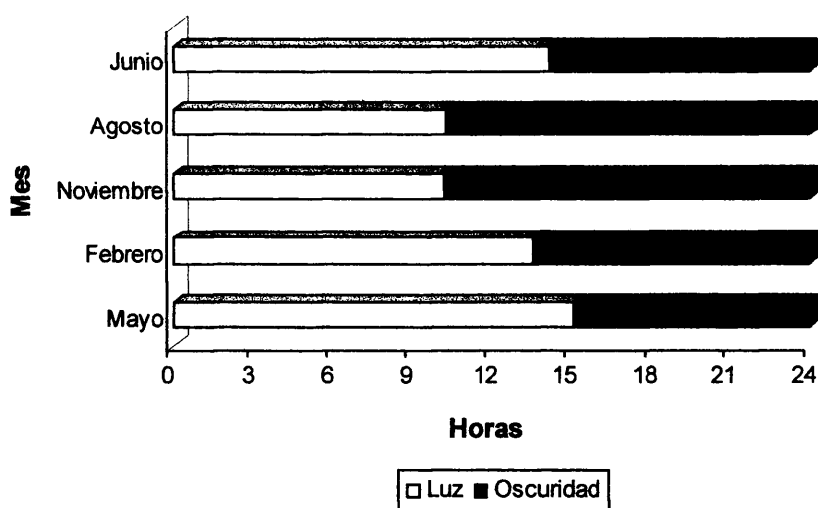
#### **2.9.2. Variaciones diarias y estacionales en el contenido hipotalámico y telencefálico de NPY y monoaminas y en los niveles plasmáticos de ghrelina y leptina en *Tinca tinca*.**

Con el fin de investigar posibles cambios diarios o estacionales de ciertos reguladores neuroendocrinos en la tenca, aclimatamos tencas adultas de ambos sexos (hembras:  $99,47 \pm 9,9$  g; machos:  $90,04 \pm 6,24$  g) en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura en varios momentos de un ciclo anual completo. Al igual que en el diseño descrito en el apartado 2.9.1., los peces se mantuvieron durante 3-4 semanas en tanques de  $5\text{ m}^3$  provistos de un sistema de renovación continua de agua. Considerando que la hora de la alimentación es un importante sincronizador ambiental y puede condicionar numerosos parámetros fisiológicos y comportamentales, a los peces de este estudio se les suministró el alimento de forma continuada a lo largo de las 24 h del día mediante la utilización de dispensadores de comida de 24 h (Corelsa, modelo Clockwork). De este modo pretendemos evitar, o al menos reducir al máximo, la influencia de este posible sincronizador exógeno. Los muestreos se realizaron en el solsticio de verano (24-6-02) y a mitad de las cuatro estaciones, verano (19-8-02), otoño (7-11-02), invierno (5-2-03) y primavera (8-5-03) ( $n = 64/\text{estación}$ ). En cada ciclo diario de 24 horas las tencas se sacrificaron cada 3 horas con el siguiente horario de muestreo: 11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00, 2:00, 5:00, 8:00 y 11:00 ( $n = 8/\text{grupo}$ ). Las muestras de sangre se obtienen por punción cardiaca y se procesan según lo indicado en el apartado 2.1.1. Tras la decapitación se extraen de inmediato el hipotálamo y el telencéfalo según se describe en el apartado 2.1.6. de esta Memoria. El fotoperiodo (L:D), las horas de salida y puesta del sol y la temperatura (máxima-mínima) del agua se resumen en la Tabla 4 y en el Esquema 16.

**Tabla 4.** Fotoperiodo diario, hora de salida y puesta de sol y temperatura del agua y ambiental en los meses del año en que se realizó el estudio.

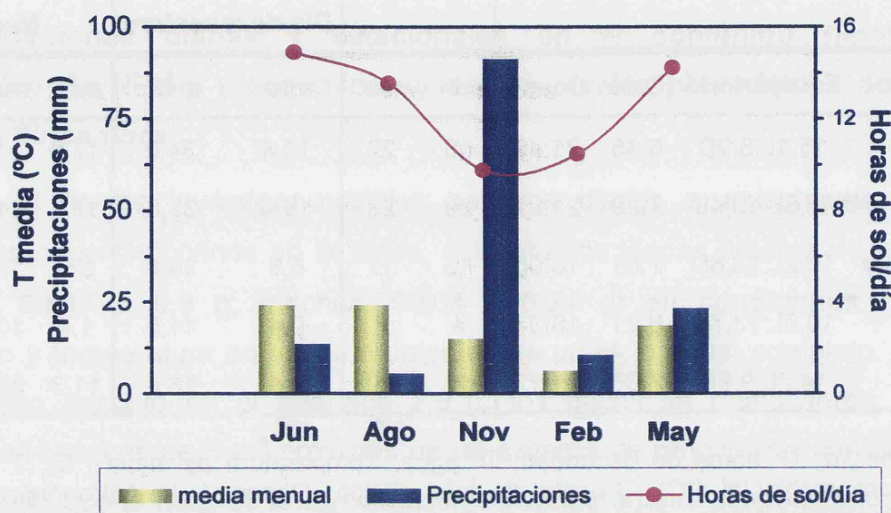
				Tª agua		Tª ambiental				
						Día de muestreo		Mensual		
Estación	Fotoperiodo	Orto	Ocaso	mín.	máx.	mín.	máx.	mín.	máx.	media
Junio	15,1L:8,9D	6:45	21:49	16	22	18,4	34,0	17,0	31,4	24,2
Agosto	13,6L:10,4D	7:29	21:07	20	23	19,0	33,6	17,2	31,3	24,2
Noviembre	10,2L:13,8D	7:51	18:05	13	17	5,8	16,4	5,9	13,7	15,0
Febrero	10,3L:13,7D	8:21	18:37	4	7	0,4	11,0	1,4	10,9	6,2
Mayo	14,2L:9,8D	7:06	21:17	15	19	9,4	18,6	11,3	26,0	18,6

L: horas de luz; D: horas de oscuridad; Tª agua: Temperatura del agua (°C); Tª ambiental: Temperatura ambiental (°C). (Fuente de información: Observatorio Astronómico Nacional, Instituto Geográfico Nacional, Ministerio de Fomento y Dirección General del Instituto Nacional de Meteorología).



**Esquema 16.** Fotoperiodos correspondientes a los días de muestreo.

En el Esquema 17 se muestran las temperaturas medias, la precipitación total y el promedio de horas de sol/día mensuales en los meses en los que se realizó el estudio.



**Esquema 17.** Temperaturas medias (°C), precipitación total (mm) y promedio de horas de sol mensuales en los meses en que se realizó el muestreo en Madrid. (Fuente de información: Observatorio Astronómico Nacional, Instituto Geográfico Nacional, Ministerio de Fomento y Dirección General del Instituto Nacional de Meteorología, Estación Meteorológica, Madrid).

#### 2.9.3. Contenido de melatonina y actividad AA-NAT en el tejido ocular de la tenca.

##### a) Variaciones diarias y estacionales en el contenido ocular de melatonina y la actividad AA-NAT en la retina neural de la tenca.

Este estudio se realizó con los mismos animales utilizados en el apartado 2.9.1., por lo que las condiciones a las que estuvieron sometidos son las indicadas en dicho apartado. Se extrajeron las copas ópticas completas y las retinas neurales para la determinación del contenido de melatonina y la actividad AA-NAT, respectivamente.

##### b) Papel de la temperatura en la regulación del contenido ocular de melatonina y de la actividad AA-NAT en la tenca.

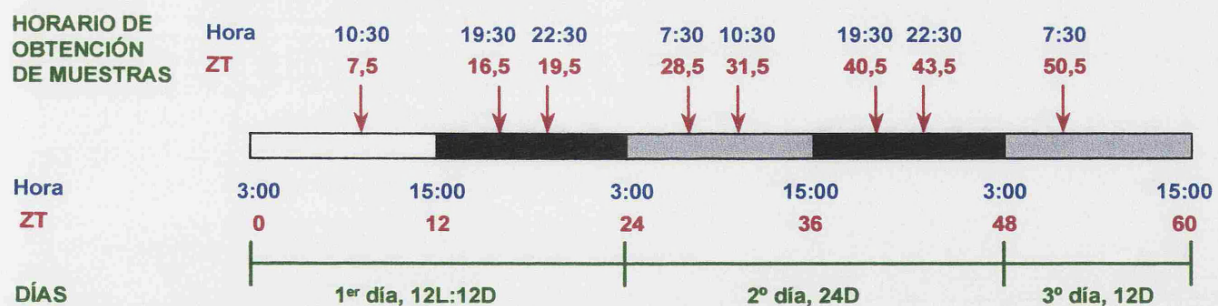
Conocido el carácter rítmico de actividad AA-NAT y de la producción de melatonina en la retina nos propusimos estudiar el papel de la temperatura en la regulación de dicha ritmicidad. Para ello, se aclimataron tencas de  $29,61 \pm 1,45$  g a un fotoperiodo 12L:12D (encendido a las 3:00 h) y dos temperaturas diferentes:  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los peces se mantuvieron en tanques de 70 l con sistemas de aireación y filtración continua de agua. El periodo de aclimatación a estas condiciones fue de aproximadamente 1 mes. Las tencas ( $n = 6-8/\text{grupo}$ ) se sacrificaron en la mitad de la fase luminosa (8:30 h) y en la



mitad de la fase oscura (20:30 h). De cada individuo una copa óptica se utilizó para la determinación del contenido de melatonina y del otro ojo se extrajo la retina neural, según el procedimiento descrito en el apartado 2.1.5., en la que se valoró la actividad AA-NAT.

**c) Estudio del posible carácter endógeno de la síntesis rítmica de melatonina y de la actividad AA-NAT ocular en la tenca.**

Durante los 15 días previos al inicio del experimento se aclimataron 56 tencas de  $12,90 \pm 0,44$  g a un fotoperiodo 12L:12D (encendido a las 3:00 h, tiempo circadiano, CT) y a una temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . El primer día del experimento se mantuvo este fotoperiodo, pero durante los dos días siguientes las tencas se exponen a oscuridad constante (DD). El horario de sacrificio de los peces se muestra a continuación (Esquema 18), es decir, el primer día del experimento se sacrificó a los peces a las 10:30, que servirá de control en luz, y a las 19:30 y 22:30 h, como controles de oscuridad ( $n = 7/\text{grupo}$ ). El segundo día se sacrificaron los peces a las 7:30, 10:30, 19:30 y 22:30 h ( $n = 7/\text{grupo}$ ), y el último día del experimento se sacrificó a los peces a las 7:30 h ( $n = 7/\text{grupo}$ ). De uno de los ojos de cada individuo se obtuvo la copa óptica, que se utilizó para la determinación del contenido de melatonina, mientras que del otro ojo se extrajo la retina neural en la que se valoró la actividad AA-NAT.



**Esquema 18.** Horario de sacrificio de los peces para el estudio del posible carácter endógeno de la síntesis rítmica de melatonina y de la actividad AA-NAT ocular en la tenca. Las barras horizontales blancas corresponden con exposición a luz, las negras con exposición a oscuridad y las grises a la fotofase subjetiva durante 24D.



#### **IV. RESULTADOS**





## 1. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN LA HEMATOLOGÍA, BIOQUÍMICA PLASMÁTICA Y RESERVAS METABÓLICAS EN *Tinca tinca*.

### 1.1. ESTUDIO HEMATOLÓGICO.

Las variaciones estacionales de los diferentes parámetros de la serie roja estudiados en tencas de ambos sexos se resumen en la Tabla I. Machos y hembras presentan un patrón estacional muy similar. Los valores más elevados de eritrocitos se encontraron en verano ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones) y los más bajos en otoño ( $p < 0,01$  respecto a primavera e invierno). También el hematocrito mostró los niveles más altos en verano ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones), mientras que los valores más bajos, en el caso de las hembras, se observaron en otoño. Sólo en verano se encontraron diferencias significativas entre ambos sexos en el número de eritrocitos, siendo más alto en los machos ( $p < 0,01$ ). También el hematocrito fue mayor en los machos en verano y otoño ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente).

La concentración de hemoglobina en la tenca oscila entre valores mínimos en torno a 10 g/100 ml observados en otoño y un máximo de 19,5 g/100 ml en primavera ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones). Sólo en verano se encontraron diferencias significativas entre ambos sexos, presentando los machos niveles de hemoglobina más elevados que las hembras ( $p < 0,01$ ).

Los valores de VCM fueron significativamente mayores en otoño que en el resto de las estaciones ( $p < 0,01$ ) y no mostraron diferencias entre ambos sexos excepto en otoño, donde el VCM de los machos fue más alto ( $p < 0,01$ ). Debido al elevado contenido de hemoglobina encontrado en primavera para ambos sexos, fue en esta estación donde se observaron los valores más elevados de HCM ( $p < 0,01$  respecto a verano e invierno) y de CCMH ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones).

En la Tabla II se presentan los coeficientes de correlación ( $r$ ) y la significación estadística ( $p$ ) de la relación entre el peso corporal y el índice nutricional con los parámetros de la serie roja. En los machos el peso corporal se correlaciona significativamente con los niveles de hemoglobina y, por lo tanto, también con los dos índices corpusculares relacionados con este parámetro (HCM y CCMH), siendo esta correlación de signo positivo. Ninguno de los restantes parámetros estudiados (número de hematíes, Htc y VCM) presenta una correlación estadísticamente significativa con el peso corporal. En las hembras no se ha encontrado una correlación significativa entre el peso corporal y los parámetros e índices corpusculares de la serie roja estudiados. El

Tabla I. Cambios estacionales en la serie roja (glóbulos rojos, hematocrito, hemoglobina e índices corpusculares) en la tenca (*Tinca tinca*).

	Primavera		Verano		Otoño		Invierno	
	Machos (n = 28)	Hembras (n = 20)	Machos (n = 29)	Hembras (n = 35)	Machos (n = 32)	Hembras (n = 32)	Machos (n = 30)	Hembras (n = 32)
Glóbulos rojos ( $10^3 \times \text{cels/mm}^3$ )	611 $\pm$ 40	680 $\pm$ 30	1280 $\pm$ 80 <sup>##</sup>	970 $\pm$ 70 <sup>##</sup>	376 $\pm$ 30 <sup>##</sup>	350 $\pm$ 30 <sup>##</sup>	610 $\pm$ 37	620 $\pm$ 30
Hematocrito (%)	21,35 $\pm$ 0,47	21,25 $\pm$ 0,50	41,60 $\pm$ 2,41 <sup>##</sup>	28,00 $\pm$ 1,26 <sup>##</sup>	20,70 $\pm$ 0,94 <sup>*</sup>	16,76 $\pm$ 0,96 <sup>§</sup>	19,75 $\pm$ 1,06	17,61 $\pm$ 1,06
Hemoglobina (g/100 ml)	19,48 $\pm$ 0,79 <sup>##</sup>	19,74 $\pm$ 0,82 <sup>##</sup>	12,92 $\pm$ 0,54 <sup>**</sup>	7,68 $\pm$ 0,46	10,89 $\pm$ 0,65	9,73 $\pm$ 0,62	12,16 $\pm$ 1,10	9,69 $\pm$ 0,98
VCN (fl)	372,32 $\pm$ 31,05 <sup>§§</sup>	313,20 $\pm$ 13,53 <sup>§§</sup>	330,45 $\pm$ 19,40	295,33 $\pm$ 14,19	670,76 $\pm$ 74,48 <sup>**##</sup>	515,30 $\pm$ 40,30 <sup>##</sup>	357,58 $\pm$ 35,39	294,22 $\pm$ 22,89
HCM (pg)	341,95 $\pm$ 21,30	302,74 $\pm$ 16,37	102,96 $\pm$ 5,17 <sup>&amp;&amp;</sup>	79,96 $\pm$ 2,24	307,17 $\pm$ 27,59	279,14 $\pm$ 23,49 <sup>§§</sup>	210,01 $\pm$ 19,87	172,53 $\pm$ 20,77
CCMH (%)	94,16 $\pm$ 3,11 <sup>##</sup>	95,34 $\pm$ 3,22 <sup>##</sup>	31,74 $\pm$ 1,82 <sup>&amp;&amp;</sup>	27,38 $\pm$ 0,90 <sup>&amp;&amp;</sup>	55,22 $\pm$ 3,11	60,93 $\pm$ 4,44	69,42 $\pm$ 10,92	60,59 $\pm$ 7,36

VCN: Volumen corpuscular medio; HCM: Hemoglobina corpuscular media; CCMH: Concentración corpuscular media de hemoglobina. Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. <sup>##</sup> p < 0,01 respecto a las estaciones restantes. <sup>§</sup> p < 0,05 respecto a primavera, <sup>§§</sup> p < 0,01 respecto a primavera e invierno. <sup>§§</sup> p < 0,01 respecto a verano e invierno. <sup>&&</sup> p < 0,01 respecto a otoño e invierno. <sup>\*</sup> p < 0,05, <sup>\*\*</sup> p < 0,01 machos respecto a hembras.

**Tabla II.** Coeficiente de correlación ( $r$ ) y valor  $p$  de la relación entre el peso corporal y el índice nutricional (IN) con los distintos parámetros hematológicos en la tenca (*Tinca tinca*).

		Glóbulos rojos ( $10^3 \times \text{cél}/\text{mm}^3$ )		Hematocrito (%)		Hemoglobina (g/100 ml)		VCM (fl)		HCM (pg)		CCMH (%)	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Peso corporal (g)	$r$	0,065	0,172	-0,011	0,129	0,527	0,172	-0,179	-0,112	0,327	0,015	0,345	0,05
	$p$	0,568	0,143	0,927	0,301	< 0,001	0,142	0,151	0,383	0,004	0,901	0,004	0,70
IN (g/cm <sup>3</sup> )	$r$	0,052	0,031	-0,060	0,003	-0,081	0,091	-0,232	-0,035	-0,055	-0,111	0,023	-0,136
	$p$	0,674	0,809	0,650	0,981	0,502	0,475	0,085	0,805	0,660	0,396	0,864	0,323

VCM: Volumen corpuscular medio; HCM: Hemoglobina corpuscular media; CCMH: Concentración corpuscular media de hemoglobina.

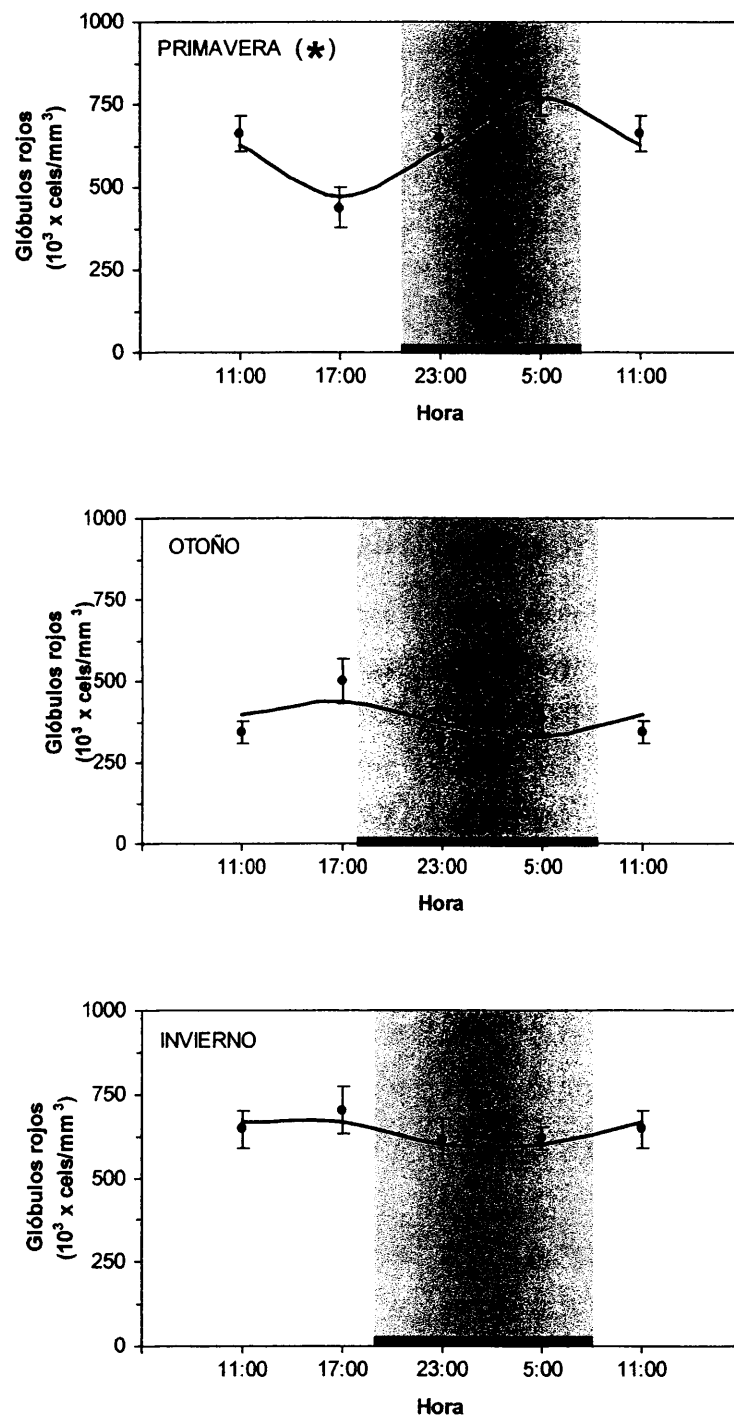
índice nutricional no se correlaciona de forma significativa con ninguno de los parámetros estudiados ni en machos ni en hembras.

En la Tabla III se muestran los parámetros de las funciones sinusoidales definidas por los valores experimentales del ritmo diario del número de glóbulos rojos, hematocrito, contenido de hemoglobina e índices corpusculares de la serie roja (sólo cuando existen diferencias significativas entre sexos se realizan dos ajustes diferentes, uno para cada sexo). Así mismo, en la Figura 1 se representa la variación diaria de los valores experimentales (media  $\pm$  e.e.m.) del número de glóbulos rojos circulantes y el ajuste de estos valores a una función sinusoidal teórica en las distintas estaciones del año. El número de eritrocitos circulantes únicamente mostró un ritmo diario significativo (ruido/señal  $< 0,3$ ) en primavera, apareciendo el valor máximo aproximadamente a las 5 h de la mañana. La amplitud sinusoidal ( $A_1$ ) fue aproximadamente tres veces mayor en primavera que en las estaciones frías (otoño e invierno). El nivel medio ( $A_0$ ) más bajo se encontró en otoño ( $382,83 \cdot 10^3 \times \text{céls/mm}^3$ ), mientras que en primavera e invierno fue muy similar y aproximadamente el doble del observado en otoño. El hematocrito (Figura 2) mostró un ritmo diario significativo en primavera y verano, presentando esta última estación el nivel medio más alto de todo el año. En verano, el hematocrito de los machos presenta un ritmo diario más marcado que en el caso de las hembras (máx/mín = 1,68 para los machos y 1,22 para las hembras), así como una amplitud superior. Los valores de hematocrito máximos aparecen en la segunda parte de la fase oscura del ciclo día/noche en verano, otoño e invierno, mientras que en primavera se registraron en la mitad de dicha fase. La concentración de hemoglobina (Figura 3) mostró un ritmo diario significativo en todas las estaciones excepto en otoño, siendo más marcado en invierno (máx/mín  $\varphi 2$ ). El nivel medio o másor más alto se observó en primavera ( $19,05 \pm 0,47 \text{ g/100 ml}$ ) y la menor amplitud se encontró en otoño ( $A_1 < 0,5$ ). En primavera, verano e invierno los valores máximos se alcanzaron en la segunda mitad de la escotofase. El volumen corpuscular medio (VCM) (Figura 4) no presentó un ritmo diario significativo en ninguna de las estaciones del año, registrándose el másor más elevado en otoño. La hemoglobina corpuscular media (HCM) (Figura 4) mostró un ritmo diario significativo (ruido/señal = 0,25) en otoño, apareciendo el máximo aproximadamente a las 12 de la noche. El másor más bajo se registró en invierno, siendo 1,7 veces menor que en primavera, estación con el nivel medio más alto. La concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH) (Figura 5) tiene un ritmo significativo en verano, (ruido/señal = 0,19), con el nivel medio más bajo de todo el año ( $A_0 < 40$ ) y la amplitud más elevada ( $A_1 = 12$ ). En otoño e invierno la CCMH mostró valores similares tanto de másor como de amplitud, siendo estos valores intermedios entre los encontrados en

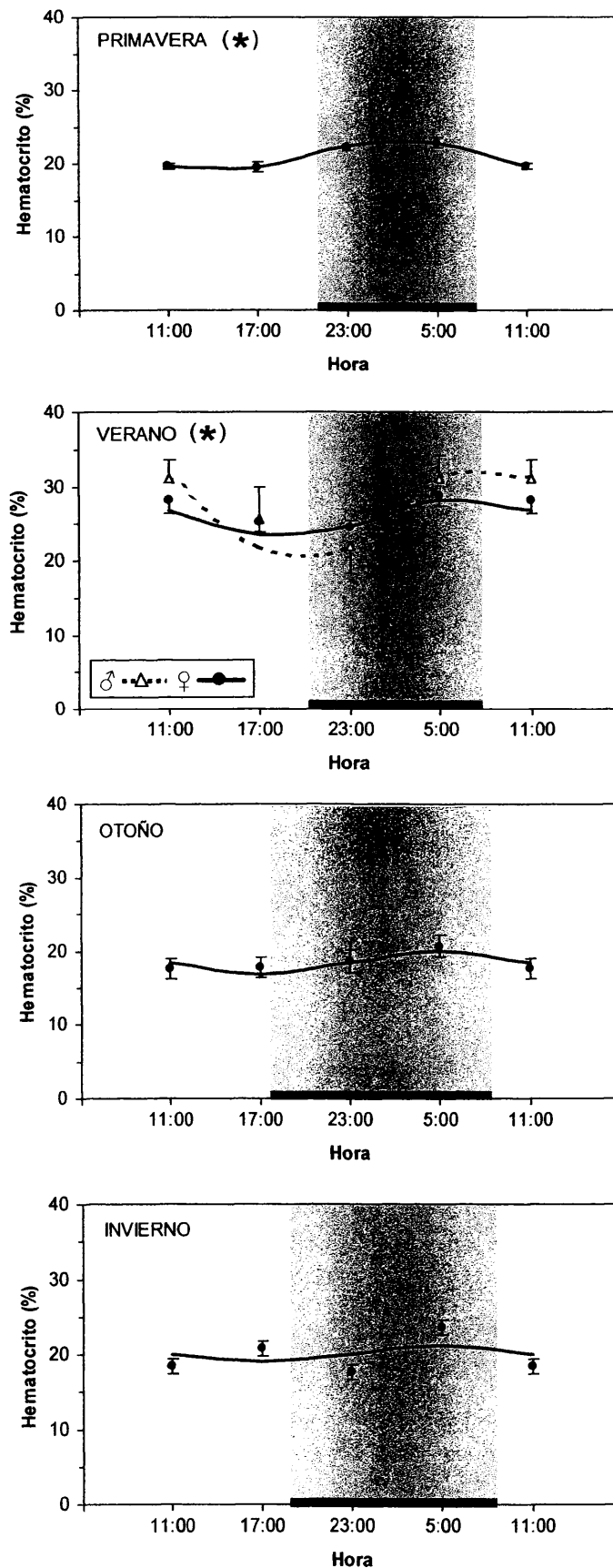
**Tabla III.** Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas de los ritmos diarios de glóbulos rojos, hematocrito, hemoglobina y de los distintos índices corpusculares de la serie roja en las cuatro estaciones del año en la tenca (*Tinca tinca*).

	Estación		$A_0$	$A_1$	$\varphi$	Máx/mín	Ruido/señal
Glóbulos rojos ( $10^3 \times \text{cels/mm}^3$ )	Primavera		620,45 ± 24,72	150,54 ± 34,93	05:08 ± 0,53	1,64	0,23*
	Verano		-	-	-	-	-
	Otoño		382,83 ± 24,13	57,69 ± 34,63	15:55 ± 1,33	1,35	0,60
	Invierno		632,62 ± 27,24	48,29 ± 38,49	13:58 ± 1,83	1,17	0,80
Hematocrito (%)	Primavera		21,01 ± 0,28	2,14 ± 0,39	02:52 ± 0,41	1,23	0,18*
	Verano	♂	26,51 ± 1,39	6,73 ± 1,96	08:52 ± 0,65	1,68	0,29*
		♀	25,80 ± 0,52	2,57 ± 0,76	06:39 ± 0,63	1,22	0,29*
	Otoño	♂	20,31 ± 0,95	3,09 ± 1,28	05:48 ± 1,05	1,36	0,41
		♀	18,30 ± 0,74	1,61 ± 1,02	04:56 ± 1,51	1,19	0,63
	Invierno		20,02 ± 0,86	1,09 ± 1,22	04:42 ± 2,52	1,12	1,12
Hemoglobina (g/100 ml)	Primavera		19,05 ± 0,47	3,83 ± 0,68	03:35 ± 0,39	1,50	0,18*
	Verano	♂	10,91 ± 0,48	2,31 ± 0,67	04:31 ± 0,68	1,54	0,29*
		♀	9,03 ± 0,51	1,69 ± 0,69	03:00 ± 1,00	1,46	0,41
	Otoño		9,74 ± 0,42	0,46 ± 0,59	02:19 ± 2,92	1,10	1,28
	Invierno		10,80 ± 0,69	3,43 ± 0,96	04:24 ± 0,67	1,93	0,28*
VCM (fl)	Primavera		401,11 ± 27,52	92,76 ± 38,93	20:06 ± 0,96	1,60	0,42
	Verano		-	-	-	-	-
	Otoño	♂	547,41 ± 60,66	75,60 ± 86,14	07:49 ± 2,57	1,32	1,14
		♀	471,77 ± 37,32	95,56 ± 52,74	00:54 ± 1,24	1,51	0,55
	Invierno		310,93 ± 18,76	64,58 ± 27,51	00:52 ± 0,91	1,52	0,43
HCM (pg)	Primavera		335,13 ± 18,73	29,03 ± 26,65	18:46 ± 2,06	1,19	0,92
	Verano		-	-	-	-	-
	Otoño		237,07 ± 13,37	74,35 ± 18,38	23:53 ± 0,60	1,91	0,25*
	Invierno		187,57 ± 13,88	53,78 ± 19,48	03:55 ± 0,84	1,80	0,36
CCMH (%)	Primavera		93,44 ± 2,22	0,66 ± 3,08	20:59 ± 11,11	1,01	4,66
	Verano		37,52 ± 1,65	11,91 ± 2,31	01:06 ± 0,45	1,93	0,19*
	Otoño		56,56 ± 2,55	4,09 ± 3,60	17:35 ± 2,02	1,16	0,88
	Invierno		53,85 ± 3,49	4,08 ± 4,94	07:54 ± 2,78	1,16	1,21

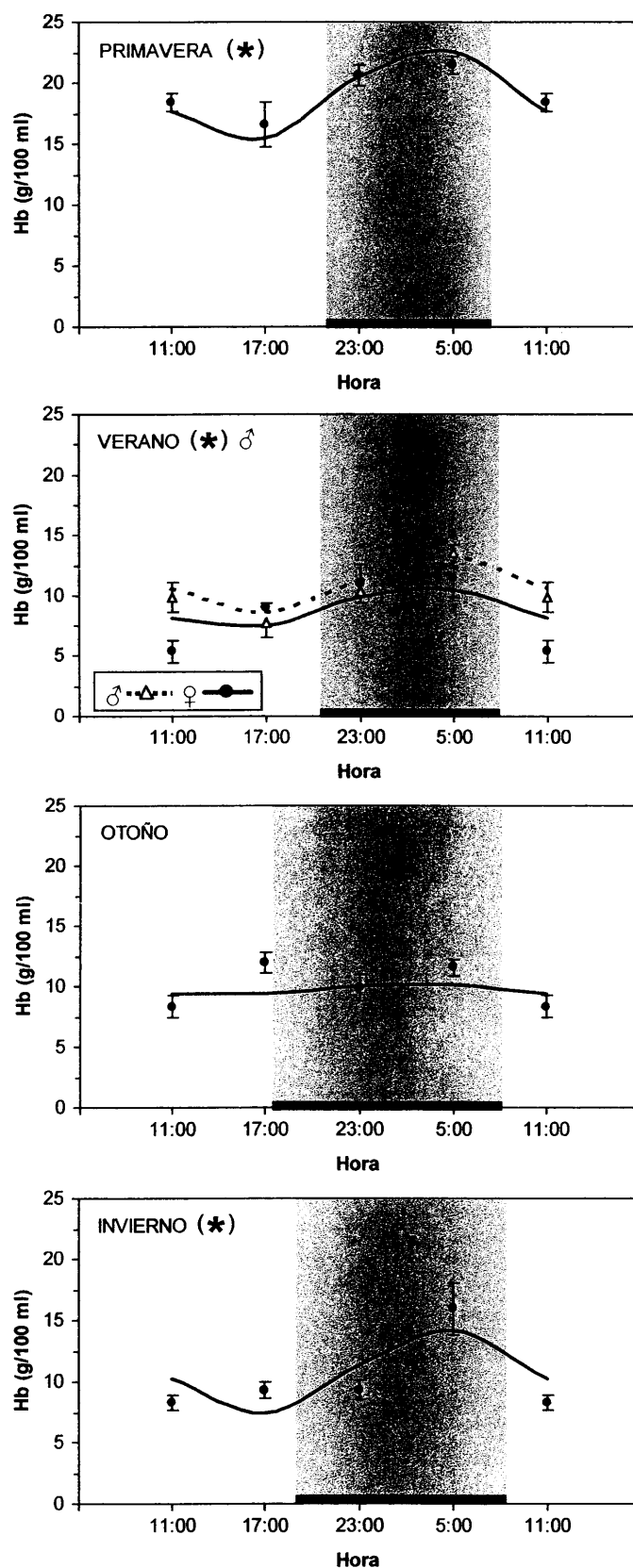
\* El ritmo es significativo (ruido/señal < 0,3), valores en negrita. Los datos se representan como media ± e.e.m.  $A_0$ : Nivel medio o méso,  $A_1$ : Amplitud sinusoidal,  $\varphi$ : Fase. (VCM: Volumen corpuscular medio; HCM: Hemoglobina corpuscular media; CCMH: Concentración corpuscular media de hemoglobina).



**Figura 1.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del número de glóbulos rojos en la tenca en tres estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n=16/\text{hora de muestreo}$ ). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ritmo significativo; ruido/señal  $< 0,3$ .

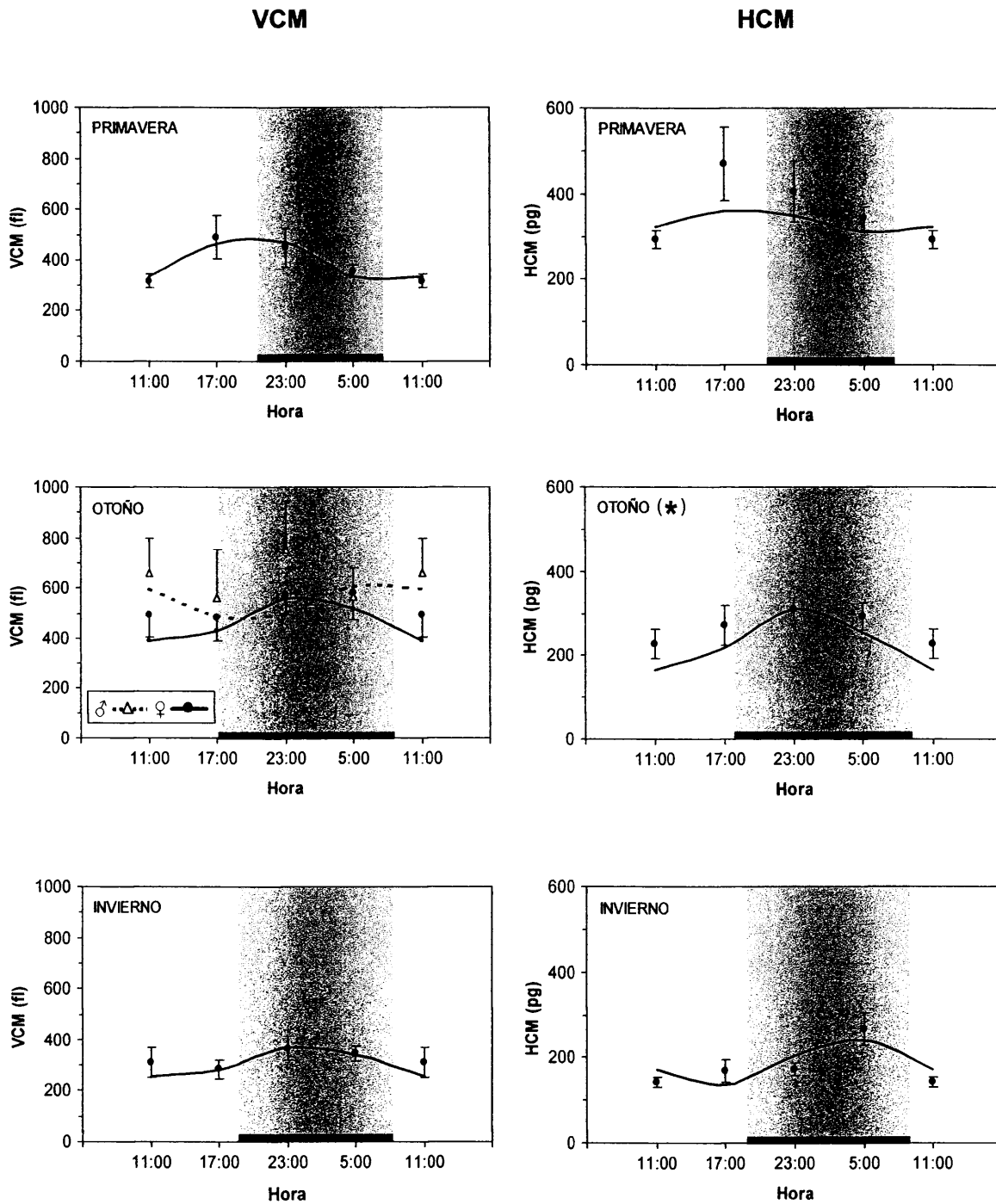


**Figura 2.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del hematocrito en la tenca en las cuatro estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n=16$ /hora de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ritmo significativo; ruido/señal  $< 0,3$ .

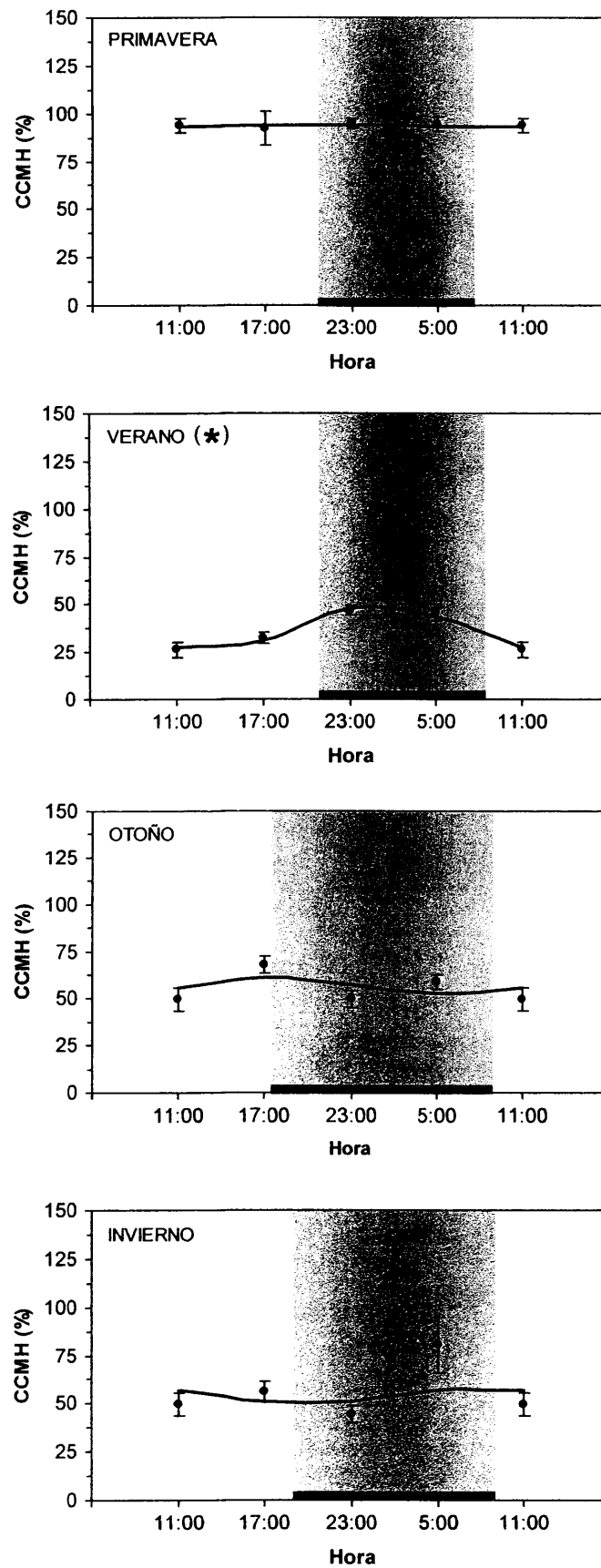


**Figura 3.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias de la hemoglobina en las cuatro estaciones del año en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 16/\text{hora de muestreo}$ ). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.





**Figura 4.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del VCM y la HCM en tres estaciones del año en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 16/\text{hora de muestreo}$ ). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.



**Figura 5.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias de la CCMH en la tenca en las cuatro estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 16/\text{hora de muestreo}$ ). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.

verano y primavera. En esta última estación, se observaron el nivel medio más alto ( $A_0 > 90$ ) y la amplitud más baja ( $A_1 < 0,7$ ).

El número total de leucocitos circulantes en la tenca (Tabla IV) aumenta progresivamente desde otoño-invierno, cuando los valores de glóbulos blancos son los más bajos del año ( $p < 0,01$  respecto a primavera), para alcanzar el valor máximo en verano ( $p < 0,01$  frente al resto de estaciones), única estación del año en la que se encontraron diferencias significativas entre ambos sexos ( $p < 0,01$  mayor en machos que en hembras). El recuento diferencial de leucocitos (Tabla IV) revela que los linfocitos son el tipo más abundante de glóbulos blancos en la tenca (35-40%). Hay un ligero incremento en verano respecto al resto de las estaciones, que sólo fue estadísticamente significativo en el caso de las hembras ( $p < 0,05$ ). El porcentaje relativo de trombocitos en los machos alcanzó los valores más elevados en primavera ( $p < 0,01$ ), siendo dicho porcentaje significativamente mayor que el encontrado en las hembras ( $p < 0,05$ ). Los granulocitos mostraron valores muy similares a lo largo del año, no encontrándose diferencias significativas ni entre distintas estaciones, ni entre sexos. Finalmente, los monocitos son el tipo celular menos abundante en la sangre de la tenca (aproximadamente el 5 % de todos los leucocitos) y su porcentaje relativo fue significativamente menor en primavera en ambos sexos ( $p < 0,01$ ), con valores muy similares en el resto de las estaciones, así como entre machos y hembras.

La Tabla V muestra los parámetros que definen el ajuste a funciones cíclicas de tipo sinusoidal de los valores experimentales del número total de leucocitos, así como de los distintos tipos celulares de la serie blanca. El número total de leucocitos mostró un ritmo diario significativo (ruido/señal  $< 0,3$ ) en primavera e invierno (Figura 6). Tanto el nivel medio de glóbulos blancos como la amplitud del ritmo fueron mayores en primavera que en las estaciones frías. Los valores más elevados aparecen a mitad de la escotofase (acrofase aproximadamente a las 2:30 h) en primavera y al inicio de la fase oscura en invierno. Respecto al recuento diferencial, ni el porcentaje de linfocitos ni el de trombocitos presentó un ritmo diario estadísticamente significativo en ninguna de las estaciones del año (Figura 7). El nivel medio de linfocitos circulantes fue similar en todas las estaciones con las amplitudes más altas en verano y las más bajas en otoño. El porcentaje relativo de trombocitos (Figura 7) mostró el nivel medio más elevado de todo el año en primavera. El ritmo diario de granulocitos circulantes (Figura 8) fue estadísticamente significativo sólo en otoño, con la acrofase a las 2:30 h de la noche. El nivel medio de este tipo celular fue más elevado en las estaciones frías del año, mientras que las amplitudes más altas se observaron en verano y otoño. Las variaciones diarias

Tabla IV. Cambios estacionales en la serie blanca (glóbulos blancos totales y porcentaje relativo de linfocitos, trombocitos, granulocitos y monocitos) en la tenca (*Tinca tinca*).

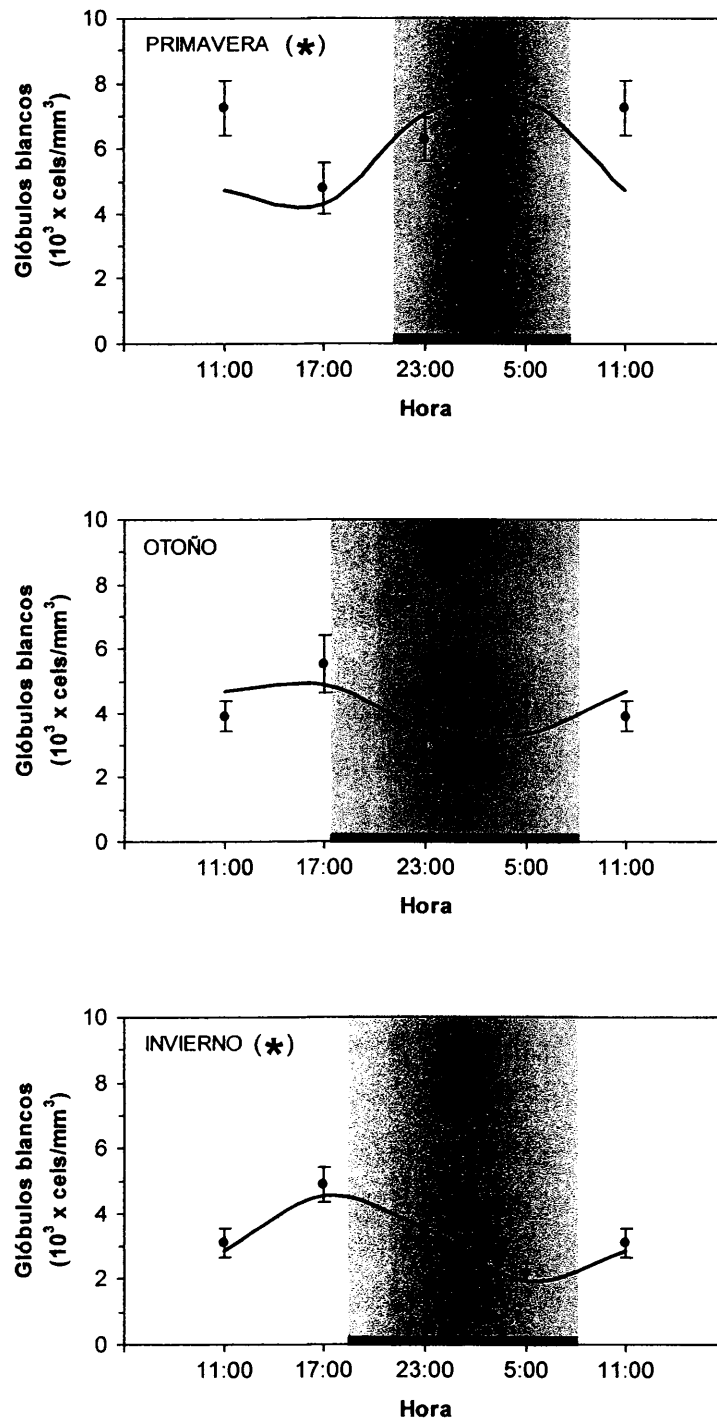
	Primavera		Verano		Otoño		Invierno	
	Machos (n = 28)	Hembras (n = 20)	Machos (n = 29)	Hembras (n = 35)	Machos (n = 32)	Hembras (n = 32)	Machos (n = 30)	Hembras (n = 32)
Glóbulos blancos ( $10^3 \times \text{cels/mm}^3$ )	6,13 $\pm$ 0,49 <sup>&amp;&amp;</sup>	6,25 $\pm$ 0,63 <sup>&amp;&amp;</sup>	19,27 $\pm$ 2,29 <sup>** &amp;&amp;</sup>	13,04 $\pm$ 1,84 <sup>##</sup>	4,14 $\pm$ 0,36	3,12 $\pm$ 0,38	3,08 $\pm$ 0,25	3,27 $\pm$ 0,35
Linfocitos (%)	35,00 $\pm$ 1,50	35,65 $\pm$ 2,04	40,98 $\pm$ 3,37	42,71 $\pm$ 2,68 <sup>#</sup>	36,17 $\pm$ 1,57	35,56 $\pm$ 1,16	34,68 $\pm$ 1,33	35,75 $\pm$ 1,35
Trombocitos (%)	38,88 $\pm$ 1,48 <sup>* ##</sup>	34,50 $\pm$ 1,23	29,01 $\pm$ 1,62	27,58 $\pm$ 2,51	28,53 $\pm$ 1,24	26,35 $\pm$ 1,32	31,36 $\pm$ 1,32	31,99 $\pm$ 1,67
Granulocitos (%)	23,48 $\pm$ 1,27	23,94 $\pm$ 1,07	21,66 $\pm$ 2,92	26,85 $\pm$ 2,46	28,40 $\pm$ 1,74	28,80 $\pm$ 1,55	28,26 $\pm$ 1,47	26,89 $\pm$ 1,74
Monocitos (%)	3,17 $\pm$ 0,35 <sup>##</sup>	2,67 $\pm$ 0,35 <sup>##</sup>	7,05 $\pm$ 0,97	5,98 $\pm$ 0,91	5,24 $\pm$ 0,69	5,51 $\pm$ 0,67	4,38 $\pm$ 0,49	5,05 $\pm$ 0,48

Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. # p < 0,05, ## p < 0,01 respecto a las estaciones restantes. && p < 0,01 respecto a otoño e invierno. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 machos respecto a hembras.

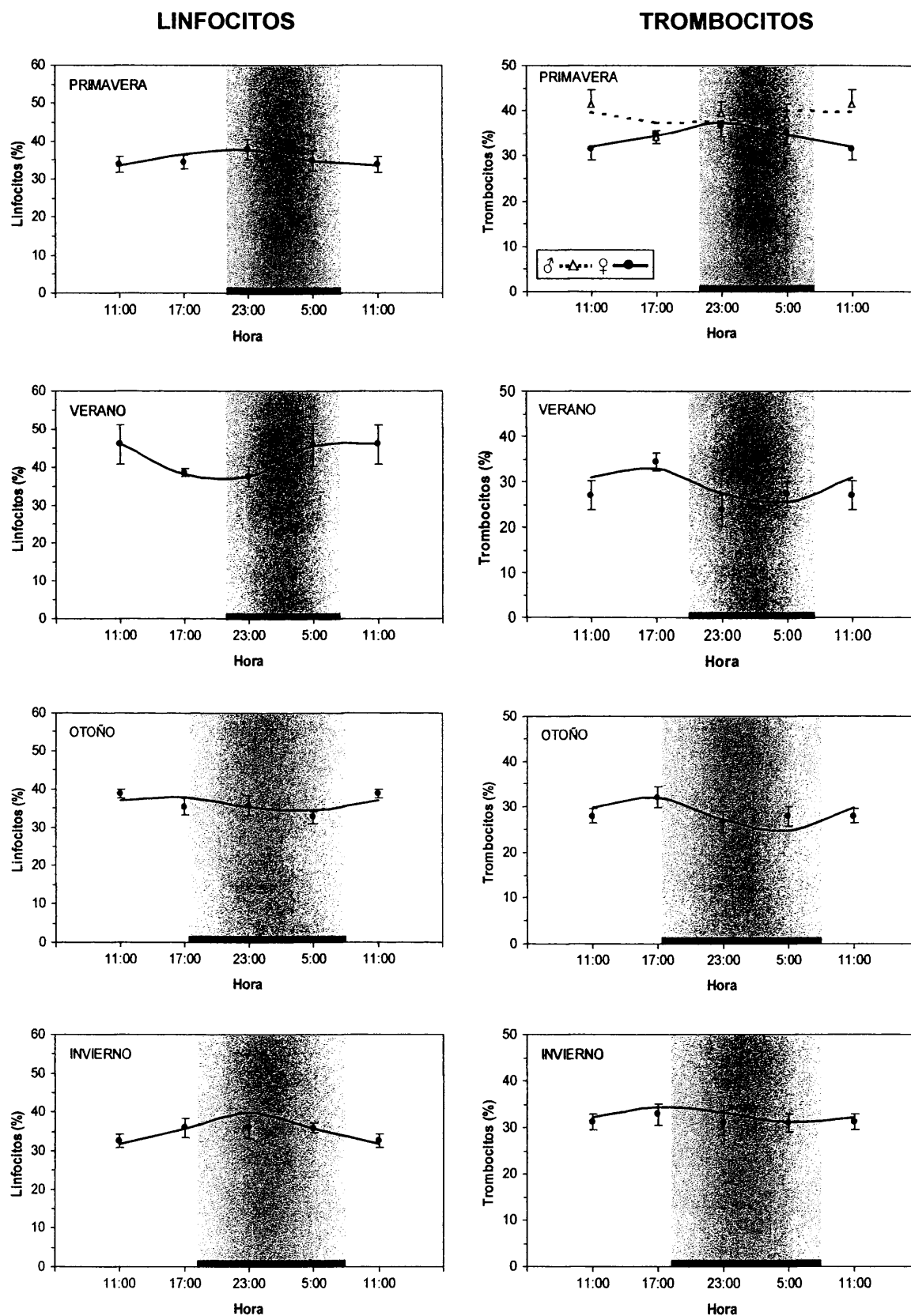
**Tabla V.** Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas de los ritmos diarios de leucocitos totales y de los distintos tipos celulares de la serie blanca en las cuatro estaciones del año en la tenca (*Tinca tinca*).

	Estación	$A_0$	$A_1$	$\phi$	Máx/mín	Ruido/señal
<b>Glóbulos blancos</b> ( $10^3 \times \text{cels/mm}^3$ )	Primavera	<b><math>5,90 \pm 0,36</math></b>	<b><math>1,97 \pm 0,51</math></b>	<b><math>02:35 \pm 0,64</math></b>	<b>2,00</b>	<b>0,26*</b>
	Verano	-	-	-	-	-
	Otoño	$4,11 \pm 0,35$	$0,97 \pm 0,49$	$14:36 \pm 1,19$	1,61	0,51
	Invierno	<b><math>3,21 \pm 0,18</math></b>	<b><math>1,34 \pm 0,26</math></b>	<b><math>17:58 \pm 0,44</math></b>	<b>2,43</b>	<b>0,19*</b>
<b>Linfocitos</b> (%)	Primavera	$35,70 \pm 1,10$	$2,23 \pm 1,54$	$21:23 \pm 1,61$	1,13	0,69
	Verano	$41,95 \pm 2,02$	$5,66 \pm 1,95$	$08:16 \pm 1,15$	1,31	0,34
	Otoño	$36,13 \pm 0,85$	$1,98 \pm 1,17$	$15:23 \pm 1,45$	1,12	0,59
	Invierno	$35,79 \pm 0,87$	$4,15 \pm 1,31$	$22:59 \pm 2,01$	1,26	0,32
<b>Trombocitos</b> (%)	Primavera	♂ $38,66 \pm 1,56$	$1,71 \pm 2,23$	$07:28 \pm 2,89$	1,09	1,31
		♀ $34,65 \pm 1,22$	$2,63 \pm 1,72$	$23:06 \pm 1,50$	1,16	0,66
	Verano	$29,29 \pm 1,41$	$4,01 \pm 1,95$	$15:20 \pm 1,17$	1,32	0,49
	Otoño	$28,43 \pm 0,93$	$3,82 \pm 1,29$	$15:38 \pm 1,24$	1,31	0,34
	Invierno	$32,70 \pm 1,02$	$1,64 \pm 1,44$	$18:07 \pm 2,01$	1,11	0,88
<b>Granulocitos</b> (%)	Primavera	$23,86 \pm 0,71$	$3,14 \pm 1,00$	$14:32 \pm 0,74$	1,30	0,32
	Verano	$24,41 \pm 1,69$	$6,25 \pm 2,47$	$22:52 \pm 0,85$	1,69	0,39
	Otoño	<b><math>28,84 \pm 0,94</math></b>	<b><math>5,89 \pm 1,31</math></b>	<b><math>02:35 \pm 0,53</math></b>	<b>1,51</b>	<b>0,22*</b>
	Invierno	$26,95 \pm 1,13$	$2,07 \pm 1,59$	$08:55 \pm 1,77$	1,17	0,77
<b>Monocitos</b> (%)	Primavera	$3,19 \pm 0,27$	$1,06 \pm 0,38$	$05:56 \pm 0,83$	1,99	0,36
	Verano	$7,29 \pm 0,63$	$2,24 \pm 0,88$	$08:28 \pm 0,91$	1,89	0,39
	Otoño	<b><math>5,89 \pm 0,55</math></b>	<b><math>2,79 \pm 0,79</math></b>	<b><math>10:52 \pm 0,63</math></b>	<b>2,79</b>	<b>0,28*</b>
	Invierno	<b><math>4,66 \pm 0,26</math></b>	<b><math>2,36 \pm 0,36</math></b>	<b><math>13:56 \pm 0,35</math></b>	<b>3,05</b>	<b>0,15*</b>

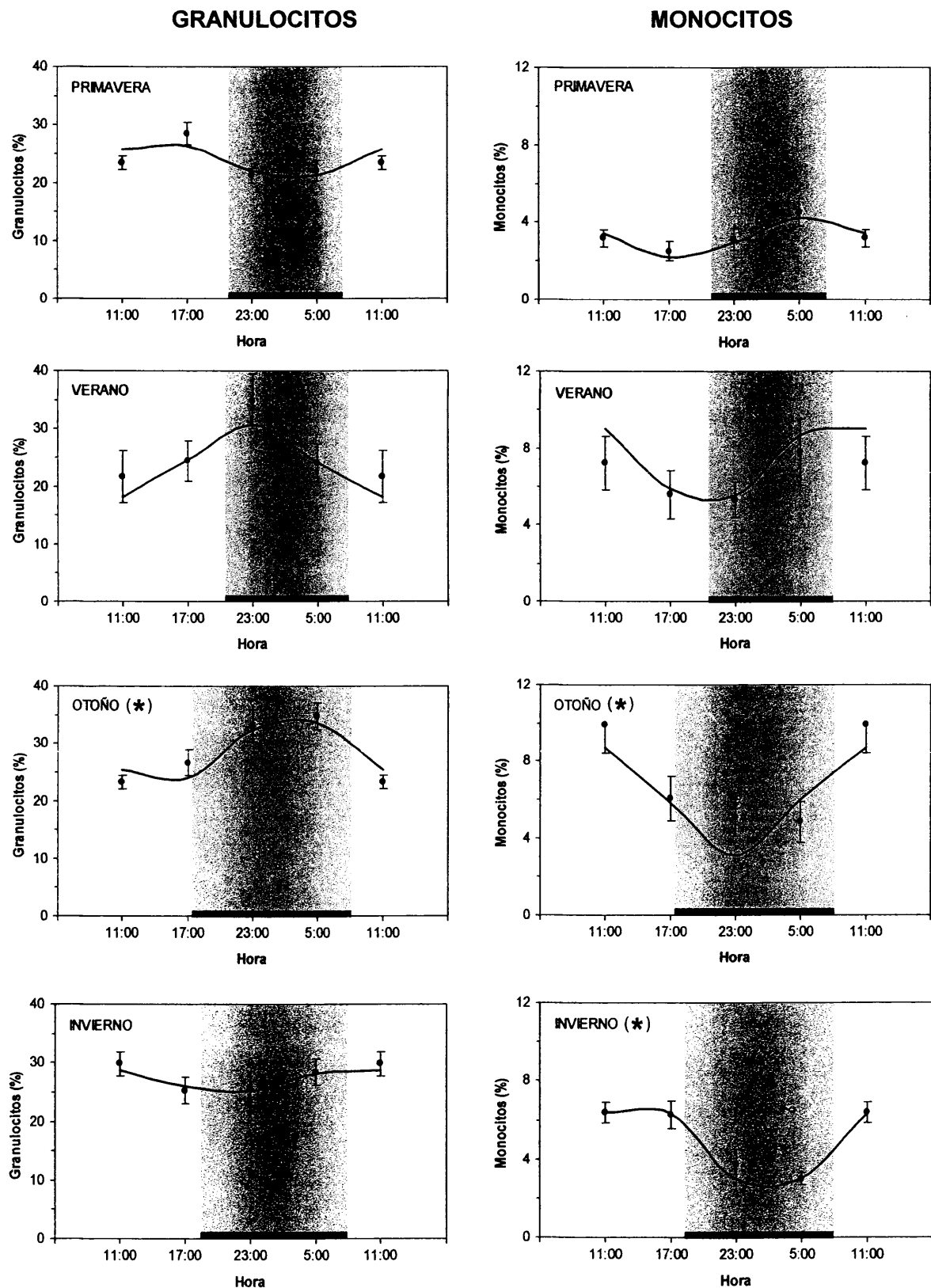
\* El ritmo es significativo (ruido/señal < 0,3), valores en negrita. Los datos se representan como media  $\pm$  e.e.m.  $A_0$ : Nivel medio o méso,  $A_1$ : Amplitud sinusoidal,  $\phi$ : Fase.



**Figura 6.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias de glóbulos blancos circulantes en la tenca en tres estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 16/\text{hora de muestreo}$ ). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.



**Figura 7.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del porcentaje relativo de linfocitos y trombocitos circulantes en las cuatro estaciones del año en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 16/\text{hora de muestreo}$ ). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo.



**Figura 8.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del porcentaje relativo de granulocitos y monocitos circulantes en la tenca en las cuatro estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 16/\text{hora de muestreo}$ ). El área sombreada representa la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.



del porcentaje de monocitos circulantes (Figura 8) muestran un ritmo significativo en otoño y en invierno. El nivel medio más elevado se observó en verano, mientras que en primavera se registraron los valores medios más bajos de todo el año, así como la menor amplitud.

## 1.2. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN LA BIOQUÍMICA PLASMÁTICA.

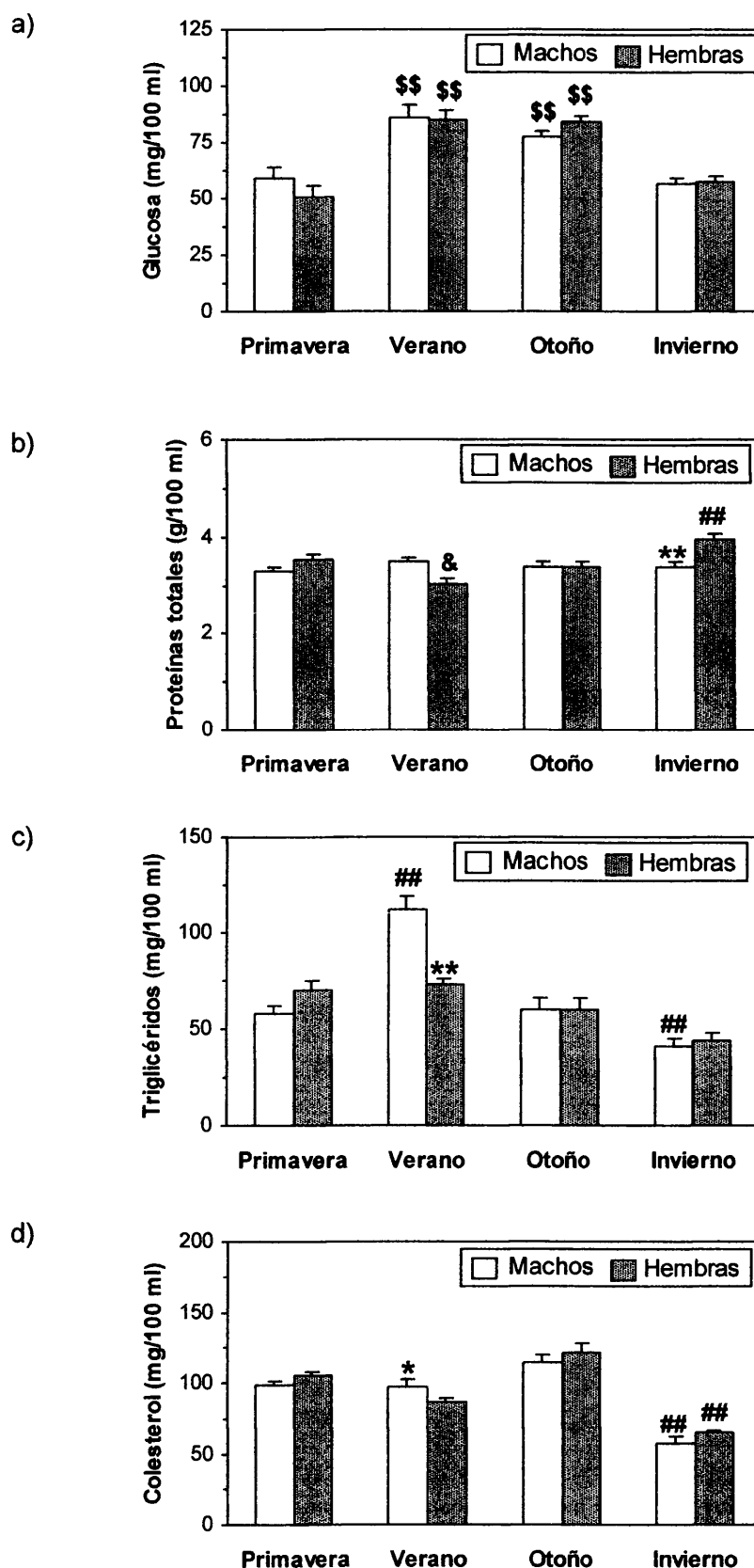
Los patrones estacionales de la concentración plasmática de glucosa, proteínas totales, triglicéridos y colesterol y se representan en la Figura 9. Los niveles circulantes de glucosa (Figura 9a) siguen un patrón estacional idéntico en machos y hembras, con niveles más bajos en invierno y primavera respecto a verano y otoño ( $p < 0,01$ ).

Mientras que en los machos las proteínas plasmáticas totales (Figura 9b) fueron muy similares a lo largo del año, en las hembras se encontraron marcadas variaciones estacionales, con los niveles más elevados en invierno ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones), y los más bajos en verano. Además, en invierno las proteínas circulantes fueron significativamente mayores en las hembras que en los machos ( $p < 0,01$ ).

El perfil estacional de triglicéridos (Figura 9c) fue similar en ambos sexos, pero al igual que sucede con el colesterol, en verano se observaron valores significativamente más altos en los machos ( $p < 0,01$ ). Los niveles plasmáticos de triglicéridos van disminuyendo desde el verano hasta alcanzar el mínimo en invierno ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones).

Finalmente, el colesterol circulante en ambos sexos (Figura 9d) es significativamente menor en invierno respecto al resto de las estaciones ( $p < 0,01$ ). El perfil estacional fue muy similar en machos y hembras, excepto en verano, donde se encontraron diferencias significativas entre ambos sexos ( $p < 0,05$ ), siendo los niveles plasmáticos de colesterol más elevados en los machos.

Los parámetros que definen las funciones sinusoidales del ajuste a los valores experimentales de los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol, triglicéridos y proteínas totales se presentan en la Tabla VI. La concentración plasmática de glucosa (Figura 10) muestra un ritmo diario significativo en invierno (ruido/señal = 0,25), con el pico durante la fase luminosa. El nivel medio o mésar fue similar en verano y otoño (aproximadamente 80 mg/100 ml) y superior al observado en primavera e invierno, mientras que la amplitud más baja se observó en otoño. La concentración plasmática de proteínas totales (Figura 10) no mostró un ritmo diario significativo en ninguna de las estaciones del año



**Figura 9.** Cambios estacionales en los niveles plasmáticos de a) glucosa, b) proteínas totales, c) triglicéridos y d) colesterol en la tenca (*Tinca tinca*). Los datos se expresan como media  $\pm$  e.e.m. ( $n=32$ /grupo). ##:  $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones, \$\$:  $p < 0,01$  respecto a primavera e invierno, &:  $p < 0,05$  respecto a primavera. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  diferencias entre machos y hembras.

(ruido señal > 0,3), siendo el mésores muy similar en primavera, verano e invierno, y ligeramente menor que en invierno. La concentración plasmática de triglicéridos (Figura 11) únicamente mostró un ritmo diario significativo en invierno con un cociente ruido/señal = 0,18, una amplitud cercana a 15 mg/100 ml, un cociente máx/mín cercano a 2 y el menor nivel medio de todo el año, registrándose la acrofase en la primera parte de la fase oscura. En primavera y otoño se midieron niveles medios similares y menores que los encontrados en verano. El máximo aparece durante la fase luminosa en primavera, verano y otoño, al contrario de lo que ocurre en invierno. Durante el verano los niveles plasmáticos de colesterol (Figura 11) en las hembras varían a lo largo del día siguiendo un ritmo diario significativo (ruido/señal = 0,27). El nivel medio más bajo de todo el año se registró en invierno y el más elevado en otoño, mientras que la amplitud fue mínima en invierno y máxima en verano.

### 1.3. VARIACIONES ESTACIONALES DE LOS ÍNDICES BIOMÉTRICOS.

En la Figura 12a se representa el perfil estacional del índice nutricional (IN). Este perfil fue idéntico en ambos sexos, con los valores más elevados en primavera ( $p < 0,01$ , respecto al resto de las estaciones) y manteniéndose invariable el resto del año.

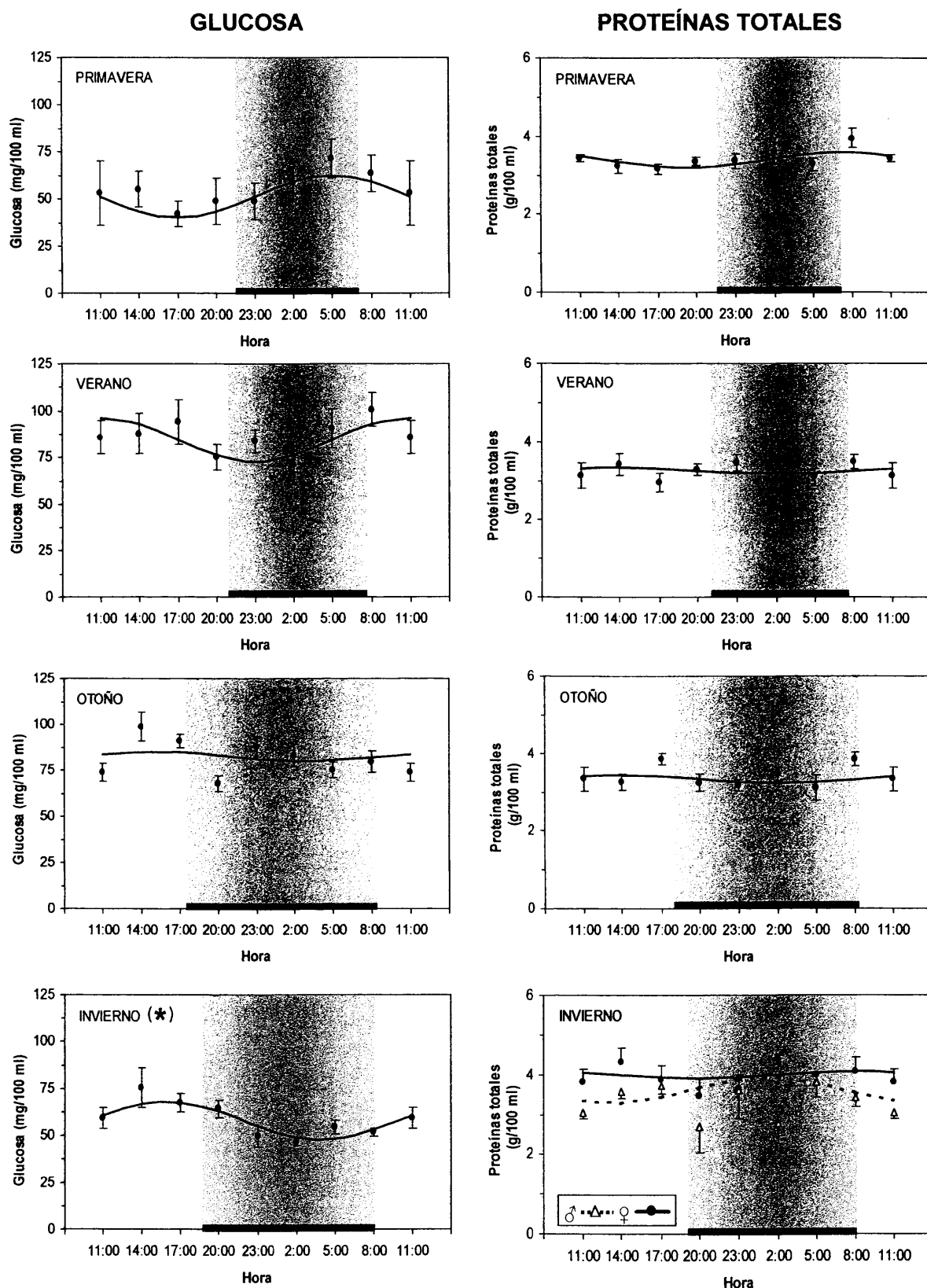
Las variaciones estacionales del índice hepatosomático (HSI) (Figura 12b) fueron similares en machos y hembras, si bien el hígado de las hembras tiene siempre mayor tamaño ( $p < 0,01$  en primavera, verano e invierno;  $p < 0,05$  en otoño respecto de los machos). Los valores más bajos del HSI se observaron en verano, e incrementan a lo largo del otoño para alcanzar el máximo en invierno ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones).

Como cabría esperar, el peso de las gónadas (Figura 12c) mostró variaciones estacionales muy acusadas, principalmente en las hembras. En primavera el ovario presenta el mayor desarrollo ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones), mostrando un descenso drástico en verano, coincidiendo con la época de freza, y permaneciendo invariable durante otoño e invierno.

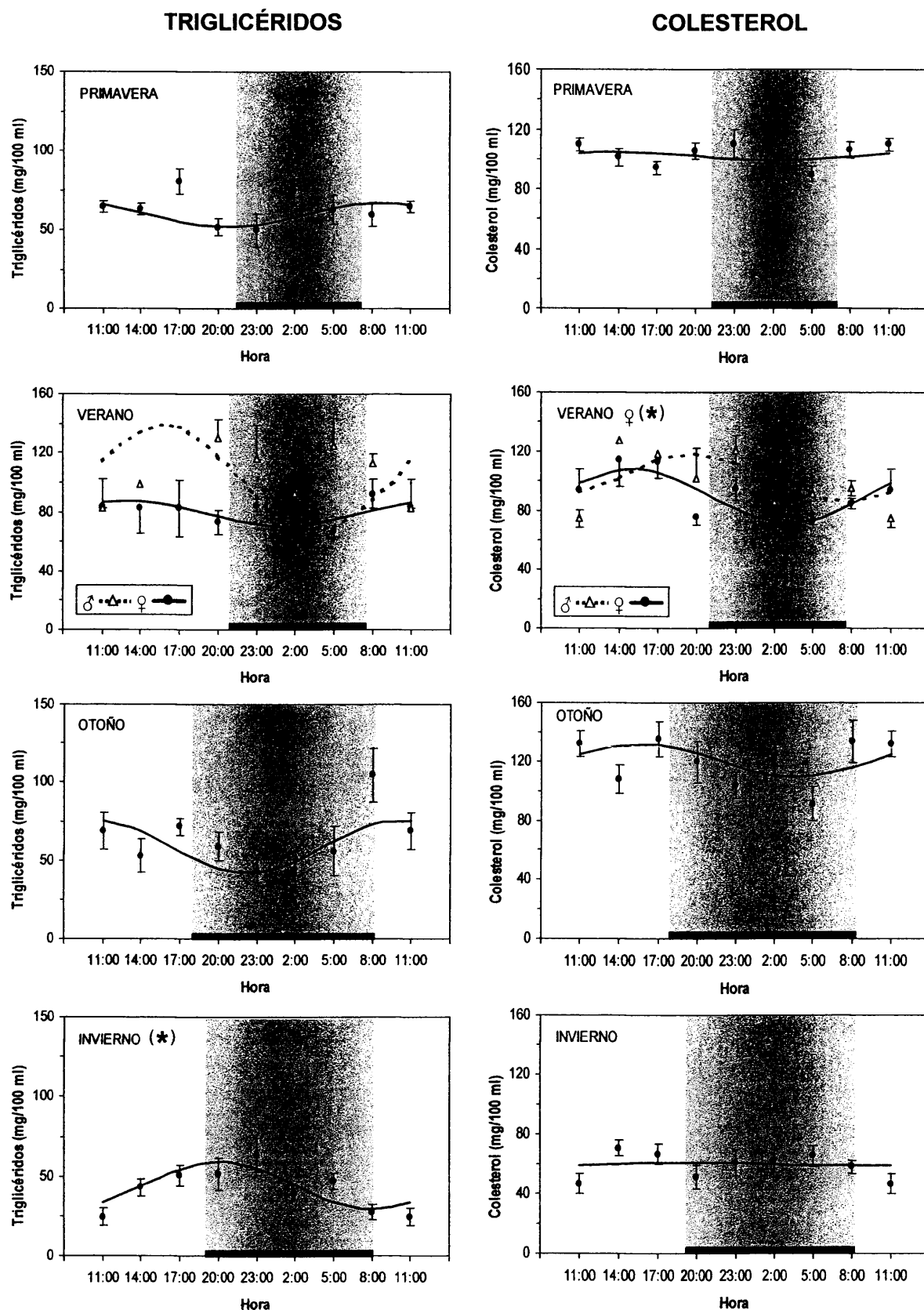
**Tabla VI.** Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas de los ritmos diarios de las concentraciones plasmáticas de glucosa, proteínas totales, triglicéridos y colesterol en las cuatro estaciones del año en la tenca (*Tinca tinca*).

	Estación		$A_0$	$A_1$	$\phi$	Máx/mín	Ruido/señal
<b>Glucosa</b> (mg/100ml)	<b>Primavera</b>		51,25 ± 3,04	10,84 ± 4,26	05:00 ± 0,92	1,54	0,39
	<b>Verano</b>		84,52 ± 3,24	11,74 ± 4,63	11:01 ± 0,89	1,32	0,39
	<b>Otoño</b>		82,54 ± 2,07	2,46 ± 2,96	14:57 ± 2,68	1,06	1,21
	<b>Invierno</b>		<b>57,88 ± 1,70</b>	<b>10,07 ± 2,49</b>	<b>15:58 ± 0,53</b>	<b>1,42</b>	<b>0,25*</b>
<b>Proteínas totales</b> (g/100 ml)	<b>Primavera</b>		3,38 ± 0,03	0,19 ± 0,09	07:52 ± 1,08	1,12	0,47
	<b>Verano</b>		3,26 ± 0,08	0,08 ± 0,11	14:15 ± 8,15	1,05	1,43
	<b>Otoño</b>		3,33 ± 0,08	0,11 ± 0,11	14:06 ± 2,40	1,07	1,03
	<b>Invierno</b>	♂	3,60 ± 0,10	0,33 ± 0,15	01:17 ± 0,93	1,20	0,45
		♀	4,00 ± 0,10	0,09 ± 0,14	07:17 ± 3,77	1,05	1,60
<b>Triglicéridos</b> (mg/100 ml)	<b>Primavera</b>		59,50 ± 2,68	7,63 ± 3,78	08:43 ± 1,13	1,29	0,50
	<b>Verano</b>	♂	103,00 ± 8,02	34,40 ± 11,94	15:42 ± 0,64	2,00	0,35
		♀	79,16 ± 3,72	8,84 ± 5,33	13:04 ± 1,32	1,25	0,60
	<b>Otoño</b>		58,86 ± 3,76	17,04 ± 5,29	10:18 ± 0,72	1,81	0,31
	<b>Invierno</b>		<b>44,23 ± 1,94</b>	<b>14,87 ± 2,71</b>	<b>20:05 ± 0,43</b>	<b>2,01</b>	<b>0,18*</b>
<b>Colesterol</b> (mg/100 ml)	<b>Primavera</b>		101,72 ± 2,20	2,51 ± 3,11	14:14 ± 1,83	1,05	1,24
	<b>Verano</b>	♂	102,07 ± 5,08	16,59 ± 6,16	19:10 ± 1,02	1,39	0,37
		♀	<b>89,68 ± 3,58</b>	<b>18,25 ± 4,97</b>	<b>15:06 ± 0,64</b>	<b>1,51</b>	<b>0,27*</b>
	<b>Otoño</b>		120,54 ± 4,21	11,00 ± 6,02	15:37 ± 1,23	1,20	0,55
	<b>Invierno</b>		60,16 ± 2,53	0,91 ± 3,45	20:12 ± 9,12	1,03	3,92

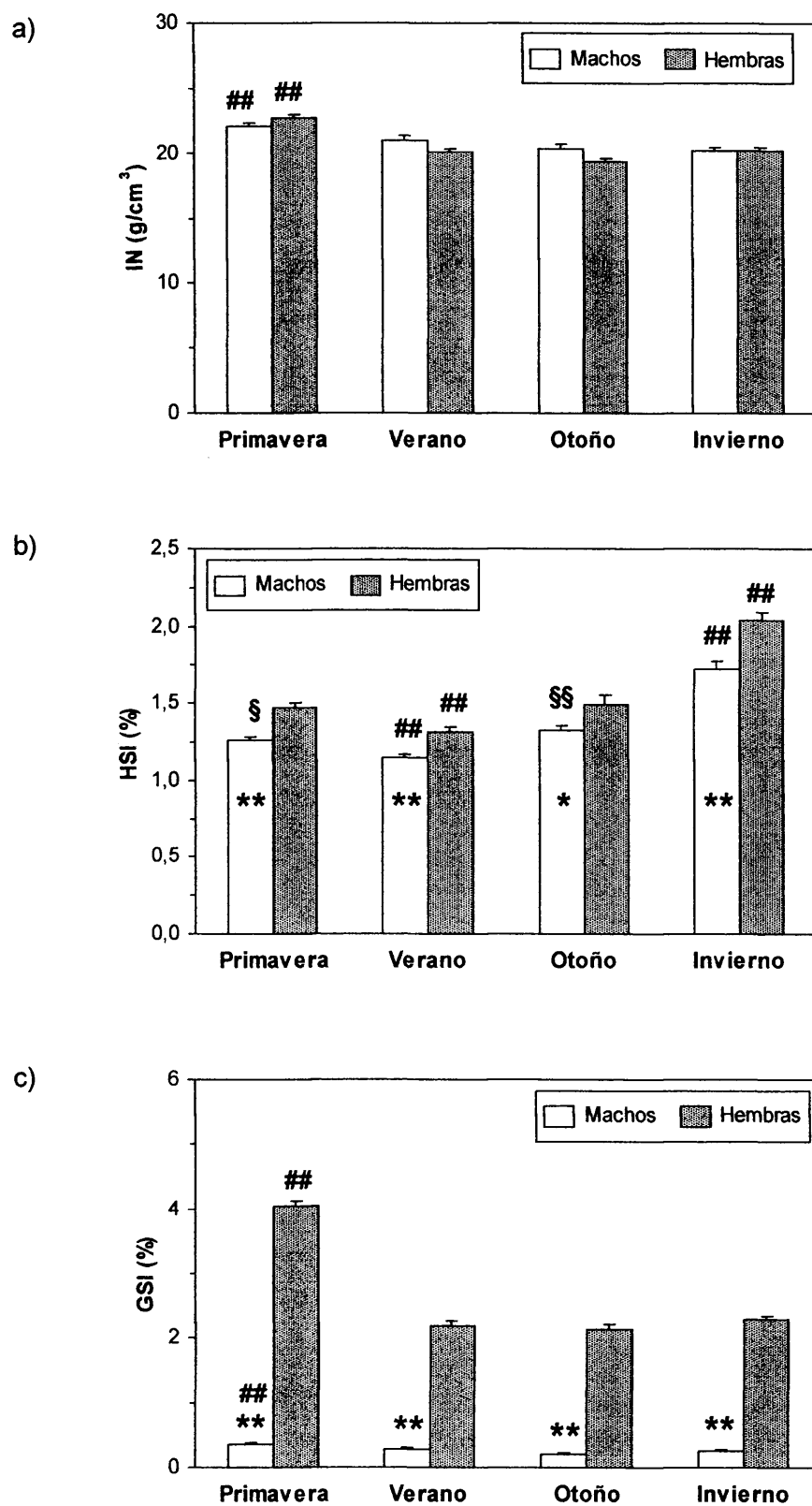
\* El ritmo es significativo (ruido/señal < 0,3), valores en negrita. Los datos se representan como media ± e.e.m.  $A_0$ : Nivel medio o méso,  $A_1$ : Amplitud sinusoidal,  $\phi$ : Fase.



**Figura 10.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias de los niveles plasmáticos de glucosa y proteínas totales en la tenca en las cuatro estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n=8$ /hora de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.



**Figura 11.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol en la tenca en las cuatro estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 8/\text{hora}$  de muestreo). El área sombreada representa la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.



**Figura 12.** Cambios estacionales en a) índice nutricional (IN), b) índice hepatosomático (HSI) y c) índice gonadosomático (GSI) en tencas adultas de ambos sexos. Los datos representan la media  $\pm$  e.e.m. ( $n = 32/\text{grupo}$ ). ##:  $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones, \$:  $p < 0,05$ , §§:  $p < 0,01$  respecto a verano e invierno, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  diferencias entre sexos.

#### 1.4. CAMBIOS DIARIOS Y ESTACIONALES EN LAS RESERVAS METABÓLICAS.

Los cambios estacionales en el contenido hepático de proteínas totales, lípidos y glucógeno se muestran en la Figura 13.

Las proteínas (Figura 13a) fueron más altas en otoño ( $p < 0,01$ ) e invierno (machos:  $p < 0,05$ ; hembras:  $p < 0,01$ ) respecto a primavera y verano en ambos sexos. Sólo en primavera y verano el contenido hepático de proteínas fue significativamente mayor en los machos que en las hembras ( $p < 0,01$ ), en las que el menor contenido se observó en verano ( $p < 0,01$ , respecto a las estaciones restantes).

El hígado presentó su mayor contenido en lípidos (Figura 13b) en verano, en ambos sexos, disminuyendo significativamente desde esta estación hasta invierno. En las hembras los valores más bajos se observaron en otoño ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones). El contenido hepático de lípidos fue significativamente mayor en los machos respecto a las hembras en verano y otoño ( $p < 0,01$ ).

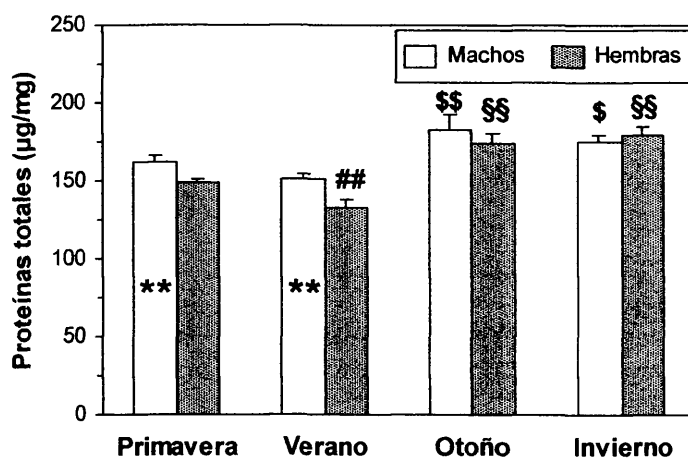
Como puede observarse en la Figura 13c, las variaciones estacionales en el contenido hepático de glucógeno en la tenca son paralelas en ambos sexos, encontrando los valores mínimos en primavera ( $p < 0,01$ ). En verano e invierno las hembras tienen mayor contenido de glucógeno hepático que los machos ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente).

En la Tabla VII presentamos los parámetros que definen las funciones sinusoidales del ajuste a los valores experimentales del contenido hepático diario de proteínas totales, lípidos y glucógeno en las cuatro estaciones del año. Las proteínas del hígado no mostraron un ritmo diario significativo en ninguna de las estaciones del año (Figura 14), con el nivel medio más elevado (170-180  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) en las estaciones frías. El contenido lipídico del hígado (Figura 15) presentó un ritmo diario significativo (ruido/señal = 0,16) en primavera, con la acrofase entorno a las 12 h del mediodía y los niveles más bajos hacia la mitad de la fase oscura del ciclo día/noche. En otoño el perfil del ritmo fue similar al de primavera en ambos sexos, aunque no llegó a ser significativo. Las variaciones diarias en el contenido hepático de glucógeno (Figura 16) siguieron un ritmo que resultó ser significativo en primavera, verano (machos) e invierno (hembras). El valor medio más bajo se registró en primavera, siendo aproximadamente la mitad del valor más elevado, observado en otoño. En verano, los machos presentan un ritmo diario significativo (ruido/señal  $< 0,3$ ) en el contenido hepático de glucógeno, con el valor máximo en la segunda mitad de la escotofase. En invierno el máximo se alcanza aproximadamente a las 2 h de la tarde en ambos sexos, pero la amplitud es mayor en las hembras.

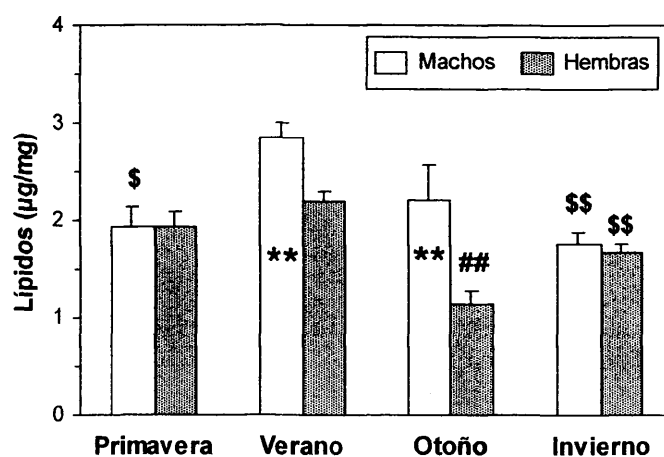


## HÍGADO

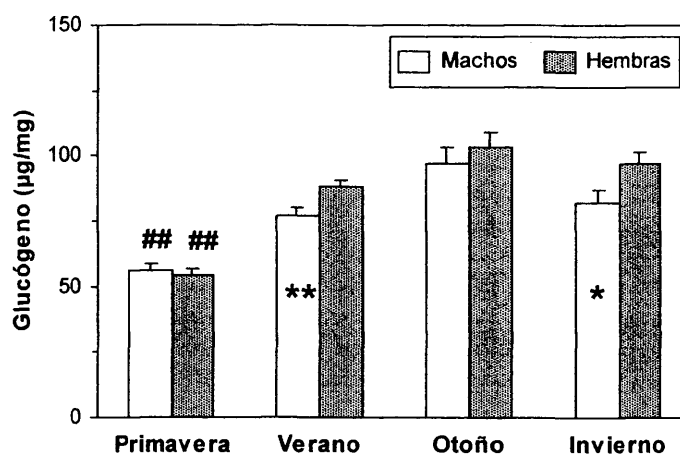
a)



b)



c)

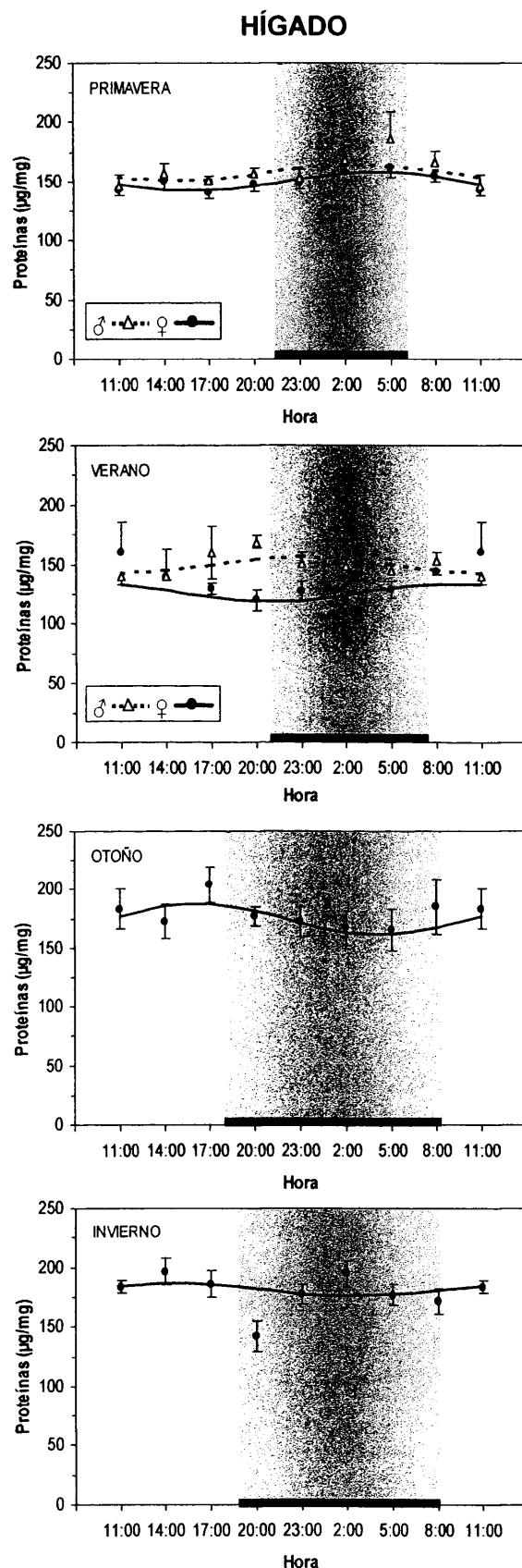


**Figura 13.** Cambios estacionales en el contenido hepático de a) proteínas totales, b) lípidos y c) glucógeno en tencas adultas de ambos sexos. Los datos representan la media  $\pm$  e.e.m. ( $n = 32/\text{grupo}$ ). ##:  $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones, \$\$:  $p < 0,01$  respecto a primavera y verano, \$:  $p < 0,05$ , \$\$:  $p < 0,01$  respecto a verano, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  diferencias entre sexos.

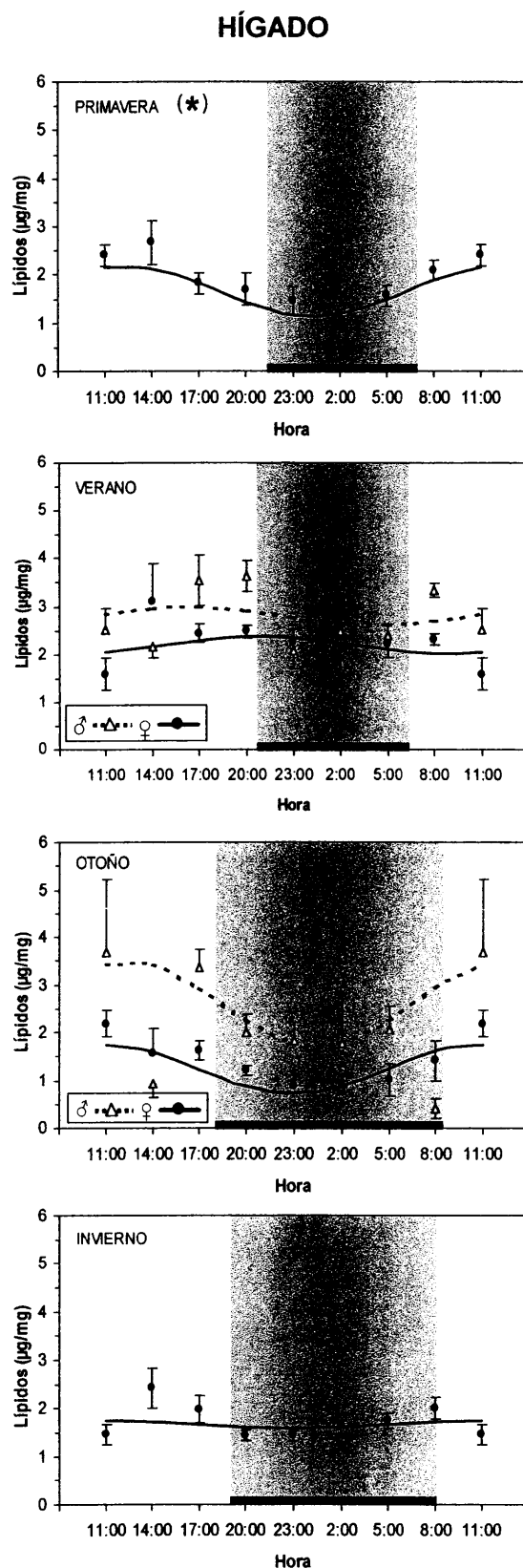
**Tabla VII.** Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas de los ritmos diarios del contenido hepático de proteínas totales, lípidos y glucógeno en las cuatro estaciones del año en la tenca (*Tinca tinca*).

Estación			$A_0$	$A_1$	$\varphi$	Máx/mín	Ruido/señal
Proteínas totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Primavera	♂	157,31 $\pm$ 2,29	7,00 $\pm$ 3,14	02:52 $\pm$ 1,09	1,09	0,45
		♀	150,10 $\pm$ 1,94	8,01 $\pm$ 2,81	03:58 $\pm$ 0,91	1,11	0,35
	Verano	♂	149,52 $\pm$ 2,91	6,85 $\pm$ 3,99	22:42 $\pm$ 1,41	1,10	0,58
		♀	126,35 $\pm$ 2,08	7,72 $\pm$ 3,08	09:15 $\pm$ 0,83	1,13	0,40
	Otoño		174,40 $\pm$ 4,90	13,48 $\pm$ 6,70	16:09 $\pm$ 1,16	1,17	0,52
	Invierno		181,01 $\pm$ 3,39	5,50 $\pm$ 4,71	14:31 $\pm$ 2,03	1,06	0,86
Lípidos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Primavera		<b>1,66 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>0,53 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>12:15 <math>\pm</math> 0,36</b>	<b>1,94</b>	<b>0,16*</b>
	Verano	♂	2,80 $\pm$ 0,15	0,19 $\pm$ 0,22	15:56 $\pm$ 2,41	1,14	1,18
		♀	2,20 $\pm$ 0,09	0,17 $\pm$ 0,12	20:42 $\pm$ 11,6	1,17	0,70
	Otoño	♂	2,59 $\pm$ 0,37	0,90 $\pm$ 0,51	12:31 $\pm$ 1,33	2,07	0,57
		♀	1,24 $\pm$ 0,13	0,51 $\pm$ 0,19	10:54 $\pm$ 0,78	2,42	0,37
	Invierno		1,67 $\pm$ 0,07	0,09 $\pm$ 0,10	10:48 $\pm$ 2,43	1,12	1,11
Glucógeno ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Primavera		<b>54,36 <math>\pm</math> 1,70</b>	<b>9,14 <math>\pm</math> 2,42</b>	<b>13:27 <math>\pm</math> 0,60</b>	<b>1,40</b>	<b>0,27*</b>
	Verano	♂	<b>72,92 <math>\pm</math> 2,44</b>	<b>12,54 <math>\pm</math> 3,37</b>	<b>06:31 <math>\pm</math> 0,64</b>	<b>1,42</b>	<b>0,27*</b>
		♀	88,33 $\pm$ 3,03	3,63 $\pm$ 4,15	04:17 $\pm$ 2,80	1,09	1,14
	Otoño		101,28 $\pm$ 3,95	17,21 $\pm$ 5,72	08:28 $\pm$ 0,73	1,41	0,33
	Invierno	♂	85,57 $\pm$ 4,59	19,24 $\pm$ 6,26	13:54 $\pm$ 0,80	1,58	0,33
		♀	<b>93,69 <math>\pm</math> 3,31</b>	<b>29,16 <math>\pm</math> 4,91</b>	<b>14:29 <math>\pm</math> 0,35</b>	<b>1,90</b>	<b>0,17*</b>

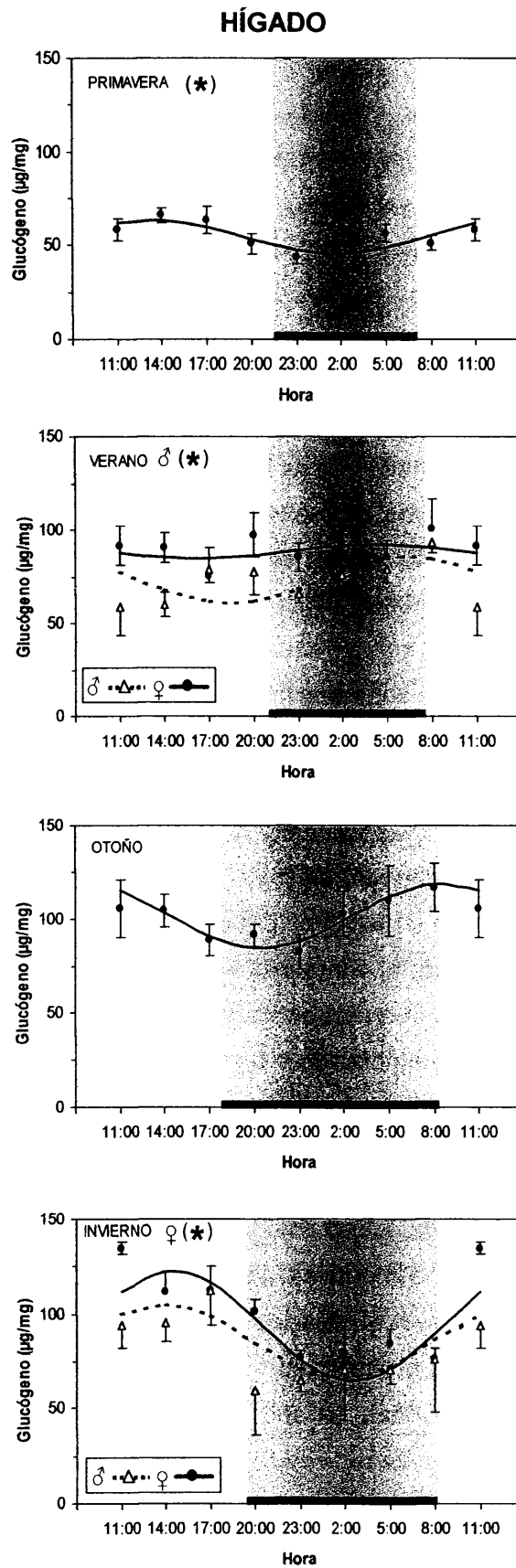
\* El ritmo es significativo (ruido/señal < 0,3), valores en negrita. Los datos se representan como media  $\pm$  e.e.m.  $A_0$ : Nivel medio o méso,  $A_1$ : Amplitud sinusoidal,  $\varphi$ : Fase.



**Figura 14.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del contenido hepático de proteínas en la tenca en las cuatro estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 8/\text{hora de muestreo}$ ). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo.



**Figura 15.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del contenido hepático de lípidos en la tenca en las cuatro estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n= 8$ /hora de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo (\*): ritmo significativo; ruido/señal  $< 0,3$ .

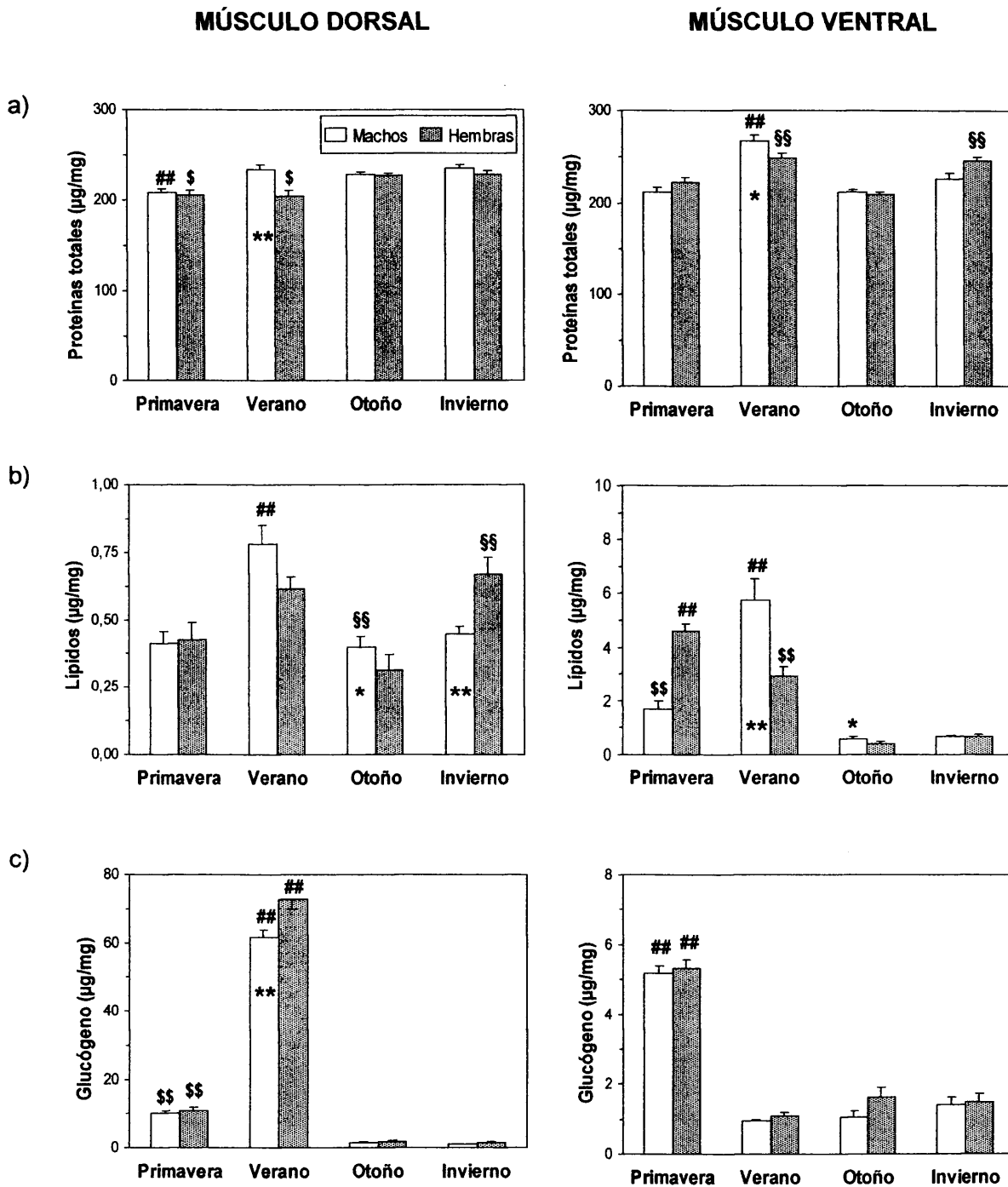


**Figura 16.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del contenido hepático de glucógeno en la tenca en las cuatro estaciones del año. Los puntos representan se representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n= 8/\text{hora}$  de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo (\*): ritmo significativo; ruido/señal  $< 0,3$ .

La Figura 17 muestra el perfil estacional de proteínas, lípidos y glucógeno en muestras de músculo dorsal y ventral en tencas de ambos sexos. El contenido de proteínas (Figura 17a) fue muy similar en ambos tipos de músculo (200-250  $\mu\text{g}$ ) mostrando ligeros cambios a lo largo del año. En el músculo dorsal, los niveles más bajos se observaron en primavera en los machos ( $p < 0,01$  respecto a las demás estaciones), y en primavera y verano en las hembras ( $p < 0,05$  respecto a otoño e invierno). El músculo ventral presentó los valores más bajos en primavera y otoño. Solamente en verano se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras, siendo el contenido de proteínas mayor en los primeros en ambos músculos.

En el músculo dorsal el contenido de lípidos (Figura 17b) varía significativamente a lo largo del año, con los valores más altos en verano e invierno y los más bajos en primavera y otoño. En las estaciones frías se hallaron diferencias significativas entre ambos sexos. En general, el músculo ventral contiene mayor cantidad de lípidos que el músculo dorsal, y presenta un patrón estacional distinto, con los niveles más bajos en otoño e invierno. En el caso de los machos, ambos tipos de músculos contienen más lípidos en verano ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones), mientras que en las hembras el máximo se alcanzó en primavera. En verano y otoño el contenido de lípidos en el músculo ventral es significativamente mayor en los machos que en las hembras ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente), mientras que en primavera es menor ( $p < 0,01$ ). El músculo dorsal acumula más glucógeno (Figura 17c) en verano ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones), siendo el contenido aproximadamente 6,5 veces mayor que en primavera y 45 veces mayor que en las estaciones frías. Sólo en verano hubo diferencias significativas entre machos y hembras ( $p < 0,01$ , mayor en las hembras). En el músculo ventral el contenido de glucógeno en primavera triplica al encontrado en el resto de las estaciones ( $p < 0,01$ ), en ambos sexos.

Las Tablas VIII y IX muestran los parámetros de las funciones sinusoidales definidas por los valores experimentales de las variaciones diarias del contenido de proteínas, lípidos y glucógeno en el músculo dorsal y ventral de la tenca. Las proteínas del músculo dorsal (Figura 18) no mostraron variaciones significativas a lo largo del ciclo diario en ninguna de las estaciones del año. Por el contrario, las proteínas del músculo ventral (Figura 18) varían claramente a lo largo del ciclo diario en primavera e invierno (ruido/señal  $< 0,3$ ), siendo este ritmo diario ligeramente más pronunciado en invierno. La acrofase es similar en ambas estaciones, presentando en primavera un ligero retraso de fase respecto al invierno. El contenido de lípidos del músculo dorsal (Figura 19) muestra un ritmo diario significativo tanto en primavera como en verano. El perfil del ritmo en



**Figura 17.** Cambios estacionales en el contenido de a) proteínas totales, b) lípidos y c) glucógeno en el músculo dorsal y el músculo ventral de tencas adultas de ambos sexos. Los datos representan la media  $\pm$  e.e.m. ( $n = 32/\text{grupo}$ ). ##:  $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones, \$\$  $p < 0,01$  respecto a primavera y otoño, \$:  $p < 0,05$ , \$\$:  $p < 0,01$  respecto a otoño e invierno, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  diferencias entre sexos.

ambas estaciones fue inverso, es decir, en primavera los niveles mínimos se alcanzan inmediatamente después de la mitad de la fase oscura, mientras que en verano son los niveles más elevados los que se alcanzan a esa hora. En otoño, el contenido de lípidos en el músculo dorsal de la tenca no varía de forma significativa a lo largo del día en ninguno de los dos sexos. En invierno la oscilación diaria es similar a la observada en verano, con la acrofase durante la fase oscura, si bien no llega a ser estadísticamente significativa. En el músculo ventral los lípidos (Figura 19) no varían de forma significativa a lo largo del día en ninguna de las estaciones del año, excepto en verano, cuando las hembras presentan una oscilación que se ajusta de forma significativa a un ritmo diario (ruido/señal = 0,22). Finalmente, el glucógeno del músculo dorsal (Figura 20) muestra oscilaciones diarias en la tenca siguiendo un ritmo que resultó significativo en primavera e invierno, si bien el ritmo observado en primavera es mucho más pronunciado que en invierno, con mayor amplitud y cociente máx/mín. El nivel medio más alto se registró en verano y el más bajo en invierno, siendo éste último unas 60 veces inferior al de verano. Los valores experimentales del contenido de glucógeno del músculo ventral (Figura 20) se ajustan a un ritmo diario significativo sólo en primavera (ruido/señal = 0,19), apareciendo los valores máximos al final de la escotofase. El valor medio más alto también se observó en primavera, siendo entre 5 y 6 veces mayor que en el resto de las estaciones. La amplitud de las oscilaciones anuales fue similar en verano, otoño e invierno y aproximadamente 5 veces menor que la del ritmo de primavera.

En la Tabla X se presentan los coeficientes de correlación ( $r$ ) y la significación estadística ( $p$ ) para las distintas relaciones que se establecen entre los índices hepatosomático, gonadosomático y nutricional con los niveles circulantes de triglicéridos, colesterol, glucosa y proteínas totales, y el contenido hepático y muscular de distintos macronutrientes en machos y hembras de tenca. En los machos, el HSI se correlaciona negativamente con los triglicéridos y el colesterol plasmáticos y los lípidos hepáticos y del músculo ventral, y positivamente con el contenido de glucógeno del hígado y del músculo dorsal y con las proteínas del músculo dorsal. El HSI en las hembras se correlaciona significativamente con prácticamente todos los parámetros estudiados, a excepción de los lípidos hepáticos, las proteínas musculares y el glucógeno del músculo ventral. La correlación es de signo negativo para triglicéridos, colesterol y glucosa circulantes, así como para el contenido de glucógeno en el músculo dorsal y de lípidos en el músculo ventral. Por el contrario, el HSI se correlacionó positivamente con las proteínas circulantes y hepáticas y con los lípidos del músculo dorsal.



**Tabla VIII.** Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas de los ritmos diarios del contenido de proteínas totales, lípidos y glucógeno en el músculo dorsal en las cuatro estaciones del año en la tenca (*Tinca tinca*).

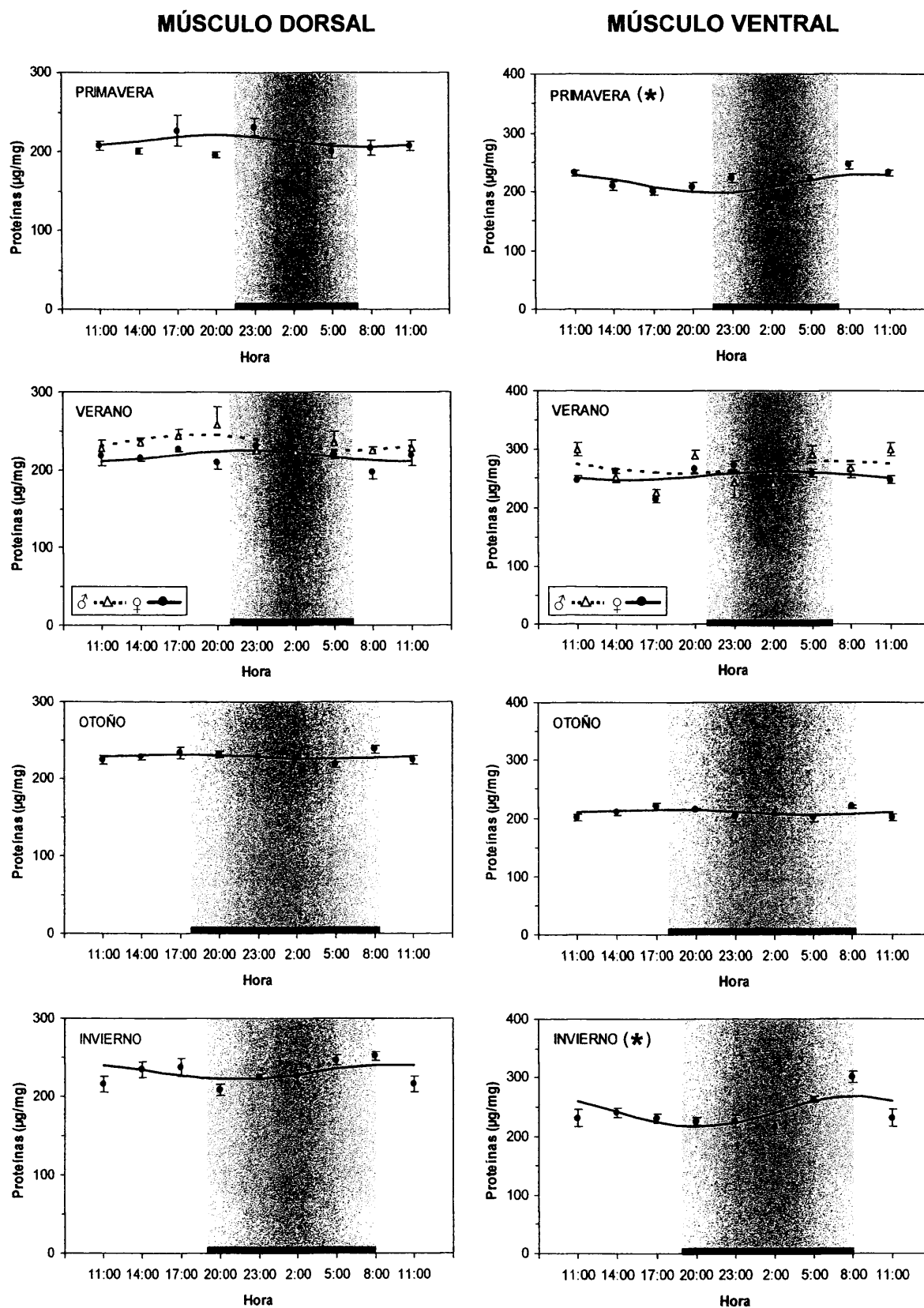
	Estación		$A_0$	$A_1$	$\varphi$	Máx/mín	Ruido/señal
<b>Proteínas totales</b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	<b>Primavera</b>		$213,32 \pm 3,17$	$7,81 \pm 4,50$	$19:52 \pm 1,32$	1,08	0,58
	<b>Verano</b>	♂	$235,29 \pm 4,38$	$10,70 \pm 5,99$	$18:31 \pm 1,38$	1,10	0,56
		♀	$218,43 \pm 2,68$	$7,43 \pm 3,81$	$22:19 \pm 1,17$	1,07	0,51
	<b>Otoño</b>		$228,56 \pm 1,81$	$2,72 \pm 2,59$	$16:32 \pm 2,14$	1,02	0,95
	<b>Invierno</b>		$231,20 \pm 3,30$	$9,46 \pm 4,60$	$09:25 \pm 2,77$	1,09	0,49
<b>Lípidos</b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	<b>Primavera</b>		<b><math>0,37 \pm 0,03</math></b>	<b><math>0,17 \pm 0,04</math></b>	<b><math>15:17 \pm 0,52</math></b>	<b>2,79</b>	<b>0,21*</b>
	<b>Verano</b>		<b><math>0,64 \pm 0,03</math></b>	<b><math>0,21 \pm 0,04</math></b>	<b><math>03:42 \pm 0,47</math></b>	<b>2,02</b>	<b>0,20*</b>
	<b>Otoño</b>	♂	$0,39 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,05$	$12:41 \pm 1,03$	1,70	0,45
		♀	$0,29 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,07$	$06:20 \pm 5,24$	1,26	2,09
	<b>Invierno</b>	♂	$0,43 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,03$	$07:42 \pm 0,82$	1,39	0,36
		♀	$0,67 \pm 0,06$	$0,21 \pm 0,09$	$04:32 \pm 0,95$	1,92	0,42
<b>Glucógeno</b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	<b>Primavera</b>		<b><math>3,17 \pm 0,28</math></b>	<b><math>1,83 \pm 0,41</math></b>	<b><math>13:19 \pm 0,49</math></b>	<b>3,73</b>	<b>0,22*</b>
	<b>Verano</b>	♂	$60,08 \pm 2,01$	$7,72 \pm 0,41$	$07:19 \pm 0,87$	1,30	0,35
		♀	$73,55 \pm 3,07$	$4,36 \pm 4,34$	$05:52 \pm 2,30$	1,13	0,99
	<b>Otoño</b>		$0,94 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,10$	$15:43 \pm 1,24$	1,90	0,34
	<b>Invierno</b>		<b><math>0,61 \pm 0,03</math></b>	<b><math>0,16 \pm 0,04</math></b>	<b><math>19:20 \pm 0,62</math></b>	<b>1,73</b>	<b>0,27*</b>

\* El ritmo es significativo (ruido/señal < 0,3), valores en negrita. Los datos se representan como media  $\pm$  e.e.m.  $A_0$ : Nivel medio o mésores,  $A_1$ : Amplitud sinusoidal,  $\varphi$ : Fase.

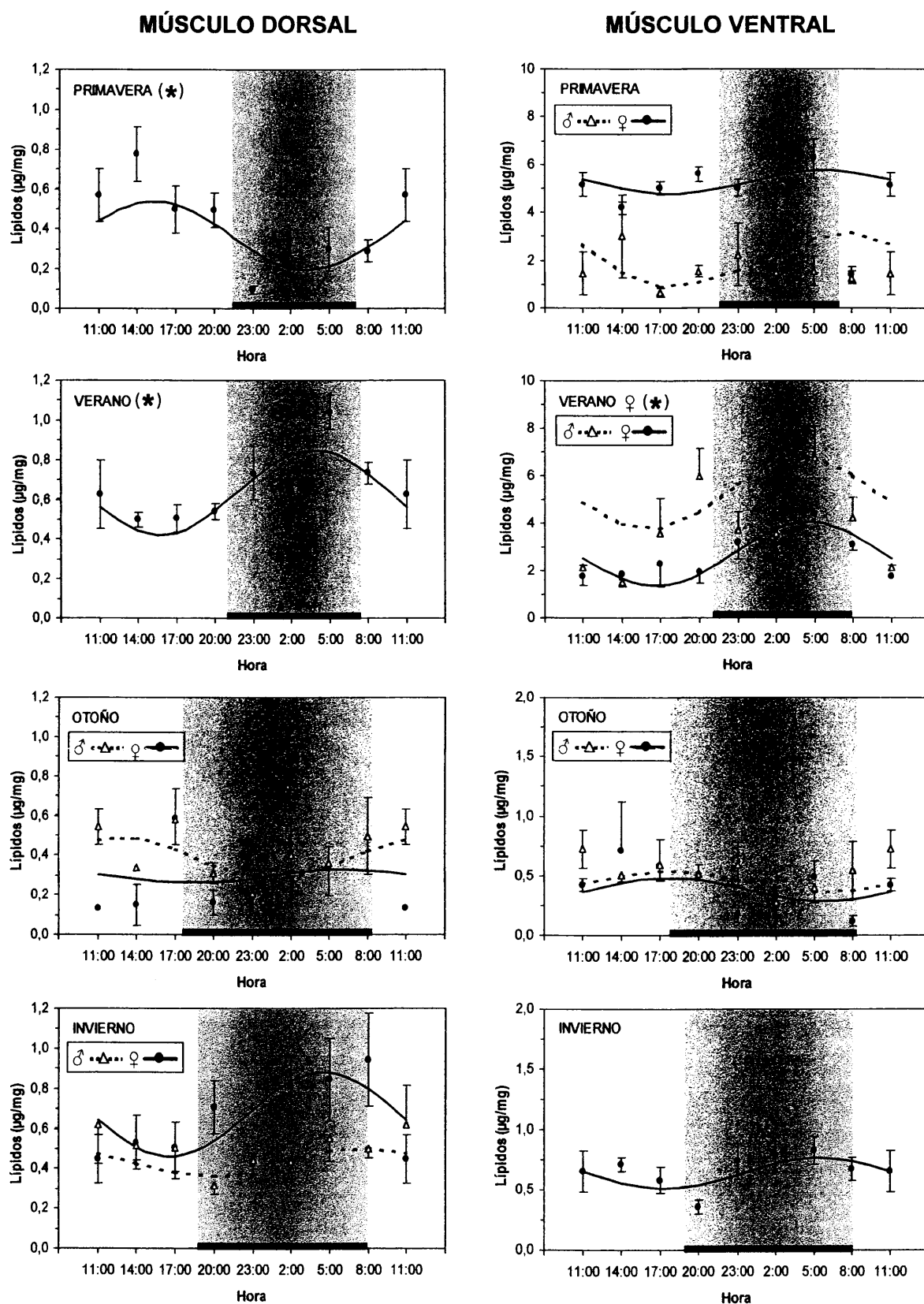
**Tabla IX.** Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas de los ritmos diarios del contenido de proteínas totales, lípidos y glucógeno en el músculo ventral en las cuatro estaciones del año en la tenca (*Tinca tinca*).

	Estación		$A_0$	$A_1$	$\varphi$	Máx/mín	Ruido/señal
<b>Proteínas totales</b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	<b>Primavera</b>		<b>213,86 <math>\pm</math> 3,19</b>	<b>16,10 <math>\pm</math> 4,51</b>	<b>09:42 <math>\pm</math> 0,64</b>	<b>1,16</b>	<b>0,28*</b>
	<b>Verano</b>	♂	269,03 $\pm$ 5,64	10,32 $\pm$ 7,54	07:14 $\pm$ 1,86	1,08	0,73
		♀	254,84 $\pm$ 3,98	7,27 $\pm$ 5,66	02:47 $\pm$ 1,75	1,06	0,78
	<b>Otoño</b>		210,11 $\pm$ 1,88	4,60 $\pm$ 2,64	17:21 $\pm$ 1,34	1,04	0,57
	<b>Invierno</b>		<b>241,32 <math>\pm</math> 4,09</b>	<b>25,46 <math>\pm</math> 5,70</b>	<b>08:08 <math>\pm</math> 0,53</b>	<b>1,24</b>	<b>0,22*</b>
<b>Lípidos</b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	<b>Primavera</b>	♂	1,89 $\pm$ 0,41	1,30 $\pm$ 0,62	07:36 $\pm$ 0,93	5,41	0,48
		♀	5,26 $\pm$ 0,18	0,49 $\pm$ 0,25	05:45 $\pm$ 1,17	1,21	0,52
	<b>Verano</b>	♂	5,26 $\pm$ 0,56	1,52 $\pm$ 0,84	04:06 $\pm$ 1,14	1,81	0,55
		♀	<b>2,69 <math>\pm</math> 0,21</b>	<b>1,35 <math>\pm</math> 0,30</b>	<b>04:34 <math>\pm</math> 0,51</b>	<b>2,99</b>	<b>0,22*</b>
	<b>Otoño</b>	♂	0,45 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,06	17:53 $\pm$ 1,58	1,48	0,71
		♀	0,38 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,06	17:46 $\pm$ 1,39	1,71	0,56
	<b>Invierno</b>		0,64 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,05	05:26 $\pm$ 1,01	1,51	0,41
	<b>Primavera</b>		<b>5,26 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>1,06 <math>\pm</math> 0,20</b>	<b>06:04 <math>\pm</math> 0,42</b>	<b>1,50</b>	<b>0,19*</b>
<b>Glucógeno</b> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	<b>Verano</b>		1,04 $\pm$ 0,07	0,23 $\pm$ 0,10	00:12 $\pm$ 0,98	1,55	0,43
	<b>Otoño</b>		1,16 $\pm$ 0,15	0,21 $\pm$ 0,22	19:39 $\pm$ 2,35	1,44	1,06
	<b>Invierno</b>		0,86 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,07	03:26 $\pm$ 0,71	1,63	0,32

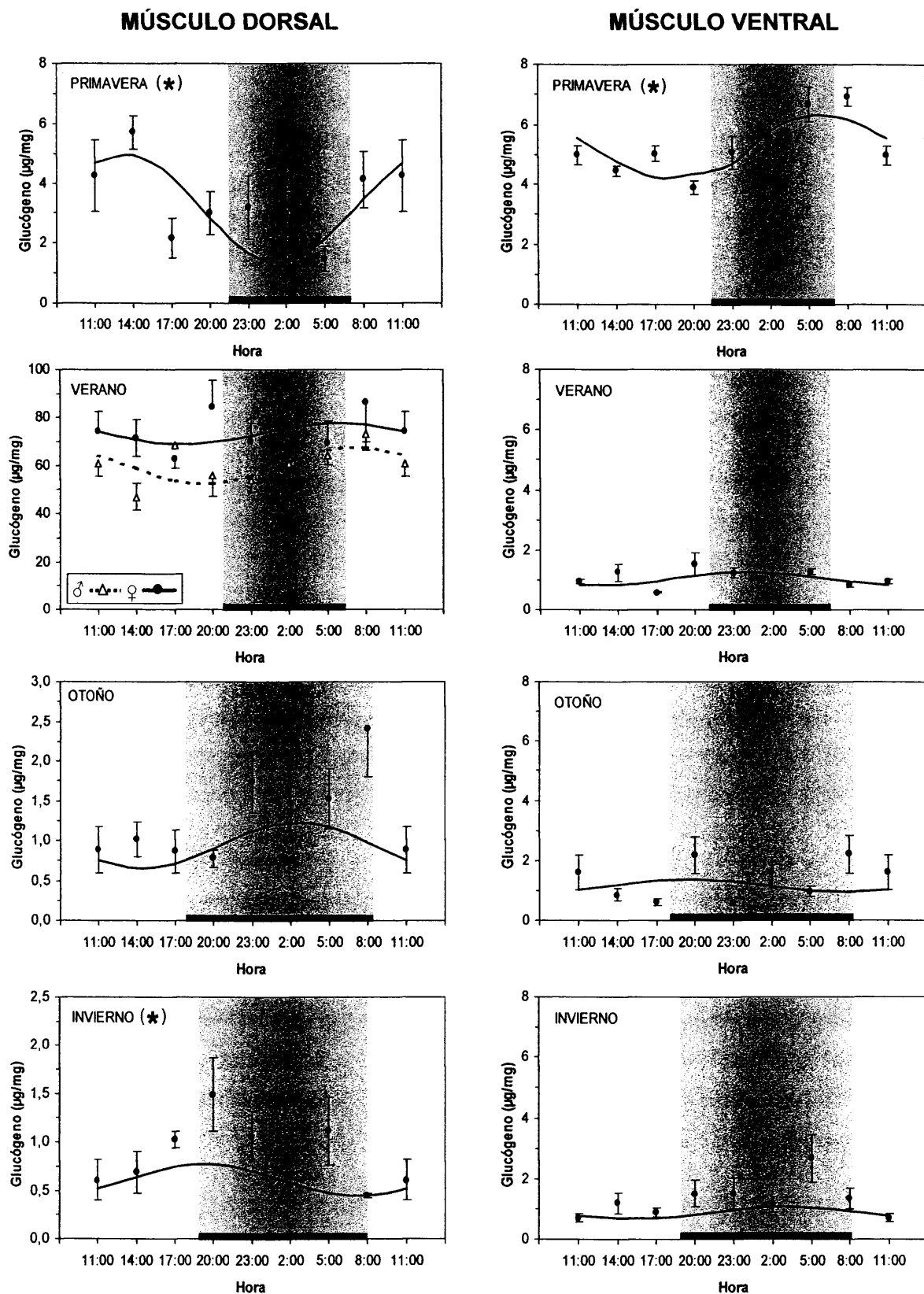
\* El ritmo es significativo (ruido/señal < 0,3), valores en negrita. Los datos se representan como media  $\pm$  e.e.m.  $A_0$ : Nivel medio o méson,  $A_1$ : Amplitud sinusoidal,  $\varphi$ : Fase.



**Figura 18.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del contenido de proteínas en el músculo dorsal y ventral en la tenca en las cuatro estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n= 8/\text{hora}$  de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ritmo significativo; ruido/señal  $< 0,3$ .



**Figura 19.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del contenido de lípidos en el músculo dorsal y ventral en la tenca en las cuatro estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n= 8/\text{hora}$  de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ritmo significativo; ruido/señal  $< 0,3$ .



**Figura 20.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del contenido de glucógeno en el músculo dorsal y ventral en la tenca en las cuatro estaciones del año. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n= 8/\text{hora}$  de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ritmo significativo; ruido/señal  $< 0,3$ .

El GSI en las hembras presenta más interacciones que en los machos. En ambos sexos muestra una correlación significativa y positiva con el IN. Respecto a los metabolitos circulantes, el GSI de los machos no presenta correlaciones significativas con ninguno de ellos, mientras que en las hembras se correlaciona positivamente con los triglicéridos, y negativamente con la glucosa plasmática. En los machos, el GSI parece estar correlacionado tanto con los lípidos como con el glucógeno hepáticos, siendo esta correlación de signo positivo para los lípidos y de signo negativo para el glucógeno. En las hembras, el GSI muestra una correlación significativa de signo negativo con el contenido de glucógeno en hígado y músculo dorsal y las proteínas del músculo ventral, y una correlación positiva con el contenido de lípidos de ambos músculos y con el contenido de glucógeno del músculo ventral.

El IN en ambos sexos muestra una correlación positiva con el colesterol y las proteínas totales circulantes. En las hembras además este índice se correlaciona significativamente con la glucosa plasmática. Respecto al contenido hepático de macronutrientes, mientras que en los machos se hallaron correlaciones estadísticamente significativas del IN con proteínas y glucógeno, en las hembras se establecieron correlaciones significativas con el glucógeno y los lípidos. En el músculo ventral los tres tipos de macronutrientes presentaron correlaciones significativas de signo positivo con el IN en las hembras, mientras que en los machos sólo el contenido de glucógeno se correlaciona significativamente con dicho índice.

En la Tabla XI se presentan los coeficientes de correlación ( $r$ ) y la significación estadística ( $p$ ) para las distintas relaciones que se establecen entre los niveles circulantes de triglicéridos, colesterol, glucosa y proteínas totales con el contenido hepático y muscular de distintos macronutrientes en tencas de ambos sexos. Respecto a los triglicéridos plasmáticos, hallamos una correlación positiva con los niveles circulantes de colesterol y con los lípidos del músculo ventral en ambos sexos. Además, en los machos se encontró una relación significativa con las proteínas plasmáticas totales y el contenido hepático de lípidos y los lípidos del músculo dorsal.

Los niveles plasmáticos de colesterol se correlacionan positivamente con la glucosa y las proteínas plasmáticas en los machos, y en las hembras únicamente con las proteínas totales del plasma. El colesterol circulante se correlaciona significativamente con el contenido hepático de lípidos en los machos. No se hallaron correlaciones significativas entre las concentraciones plasmáticas de colesterol y las reservas metabólicas de ambos tipos de músculo en los machos. En las hembras, sin embargo, este metabolito se correlaciona de forma negativa con los lípidos del músculo dorsal.

**Tabla X.** Coeficiente de correlación (*r*) y valor *p* de las relaciones entre los índices nutricional, hepatosomático y gonadosomático y los niveles circulantes de triglicéridos, colesterol, glucosa y proteínas totales, y el contenido hepático y muscular de distintos macronutrientes en machos y hembras de tenca (*Tinca tinca*).

		SANGRE				HÍGADO			MÚSCULO DORSAL			MÚSCULO VENTRAL		
		Tg (mg/dl)	Colest (mg/dl)	Gluc (mg/dl)	Prot tot (g/dl)	Prot (μg/mg)	Lip (μg/mg)	Glucg (μg/mg)	Prot (μg/mg)	Lip (μg/mg)	Glucg (μg/mg)	Prot (μg/mg)	Lip (μg/mg)	Glucg (μg/mg)
MACHOS	HSI (%)	<i>r</i>	-0,102	-0,177	0,091	0,019	-0,281	0,249	0,213	-0,187	0,411	-0,120	-0,311	-0,53
		<i>P</i>	0,295	0,064	0,307	0,846	0,003	0,009	0,024	0,067	<0,001	0,208	0,001	0,584
	GSI (%)	<i>r</i>	---	0,304	0,071	0,090	0,259	-0,457	-0,095	0,134	0,061	0,0167	0,072	0,390
		<i>P</i>	---	0,001	0,484	0,339	0,006	<0,001	0,314	0,189	0,548	0,860	0,458	<0,001
	IN (g/cm <sup>3</sup> )	<i>r</i>	---	---	0,265	0,268	0,176	-0,340	-0,023	0,172	0,004	0,167	0,0968	0,280
		<i>P</i>	---	---	0,007	0,004	0,065	<0,001	0,802	0,089	0,972	0,073	0,312	0,003
HEMBRAS	HSI (%)	<i>r</i>	-0,058	0,067	0,427	0,247	-0,125	0,299	0,152	0,245	-0,461	0,158	-0,367	<0,001
		<i>P</i>	0,520	0,458	<0,001	0,004	0,171	<0,001	0,087	0,808	<0,001	0,072	<0,001	0,997
	GSI (%)	<i>r</i>	---	0,559	0,061	-0,158	-0,125	-0,529	-0,161	0,275	-0,250	-0,187	0,808	0,598
		<i>P</i>	---	<0,001	0,260	0,078	0,171	<0,001	0,008	0,004	0,008	0,037	<0,001	<0,001
	IN (g/cm <sup>3</sup> )	<i>r</i>	---	---	0,198	-0,047	0,318	-0,356	-0,112	-0,068	-0,073	0,188	0,457	0,458
		<i>P</i>	---	---	0,034	0,609	<0,001	<0,001	0,221	0,489	0,448	0,037	<0,001	<0,001

HSI: Índice hepatosomático; GSI: Índice gonadosomático; IN: Índice nutricional; Tg: Triglicéridos; Colect: Colesterol; Prot tot: Proteínas totales plasmáticas; Prot: Proteínas; Lip: Lípidos; Glucg: Glucógeno. (n = 123 machos; n = 133 hembras). En negrita se muestran las correlaciones estadísticamente significativas.

**Tabla XI.** Coeficiente de correlación ( $r$ ) y valor  $p$  de la relación entre los niveles circulantes de triglicéridos, colesterol, glucosa y proteínas totales y el contenido hepático y muscular de distintos macronutrientes en machos y hembras de tenca (*Tinca tinca*).

		SANGRE			HÍGADO			MÚSCULO DORSAL			MÚSCULO VENTRAL		
		Colest (mg/dl)	Gluc (mg/dl)	Prot tot (g/dl)	Prot ( $\mu$ g/mg)	Lip ( $\mu$ g/m)	Glucg ( $\mu$ g/mg)	Prot ( $\mu$ g/mg)	Lip ( $\mu$ g/mg)	Glucg ( $\mu$ g/mg)	Prot ( $\mu$ g/mg)	Lip ( $\mu$ g/mg)	Glucg ( $\mu$ g/mg)
MACHOS	Tg (mg/dl)	$r$ 0,354 $P$ <0,001	0,194 0,054	0,307 0,002	-0,013 0,894	0,374 <0,001	-0,037 0,718	0,233 0,020	0,528 <0,001	0,639 <0,001	0,535 <0,001	0,670 <0,001	-0,109 0,298
	Colest (mg/dl)	$r$ — $P$ —	0,201 0,046	0,493 <0,001	0,273 0,005	0,320 0,001	-0,128 0,203	0,110 0,266	0,182 0,025	0,112 0,296	0,019 0,846	0,185 0,065	0,042 0,683
	Gluc (mg/dl)	$r$ — $P$ —	— —	0,119 0,239	-0,147 0,128	0,210 0,032	0,198 0,043	0,030 0,755	0,348 <0,001	0,432 <0,001	0,177 0,067	0,186 0,061	-0,270 0,006
	Prot tot (g/dl)	$r$ — $P$ —	— —	— —	0,358 0,002	0,243 0,001	-0,182 0,069	0,245 0,012	0,356 <0,001	0,0843 0,432	0,245 0,012	0,166 0,103	-0,090 0,347
	Tg (mg/dl)	$r$ 0,356 $P$ <0,001	0,085 0,402	-0,023 0,816	-0,150 0,127	0,176 0,078	-0,062 0,536	-0,102 0,307	0,0463 0,663	0,313 0,002	0,109 0,268	0,253 0,011	0,242 0,016
HEMBRAS	Colest (mg/dl)	$r$ — $P$ —	0,154 0,106	0,230 0,013	0,208 0,024	-0,105 0,277	-0,131 0,161	-0,011 0,907	-0,256 0,010	-0,074 0,461	-0,203 0,027	0,123 0,191	0,233 0,014
	Gluc (mg/dl)	$r$ — $P$ —	— —	-0,186 0,051	-0,041 0,662	-0,041 0,671	0,294 0,001	0,010 0,919	0,024 0,810	0,304 0,002	-0,061 0,515	-0,253 0,007	-0,355 <0,001
	Prot tot (g/dl)	$r$ — $P$ —	— —	— —	0,402 <0,001	-0,105 0,274	-0,006 0,948	0,063 0,503	0,063 0,528	-0,397 <0,001	0,189 0,040	-0,144 0,124	0,137 0,153

Tg: Triglicéridos plasmáticos; Colest: Colesterol plasmático; Gluc: Glucosa plasmática; Prot tot: Proteínas totales plasmáticas; Prot: Proteínas; Lip: Lípidos; Glucg: Glucógeno. (n = 123 machos; n = 133 hembras). En negrita se muestran las correlaciones estadísticamente significativas.



Los niveles circulantes de glucosa se correlacionan significativamente con el contenido de glucógeno en los tres tejidos estudiados en ambos sexos.

En ambos sexos las proteínas plasmáticas totales muestran una correlación positiva con las proteínas hepáticas y las proteínas del músculo ventral. Además, en los machos las proteínas plasmáticas se correlacionan positivamente con las proteínas del músculo dorsal.

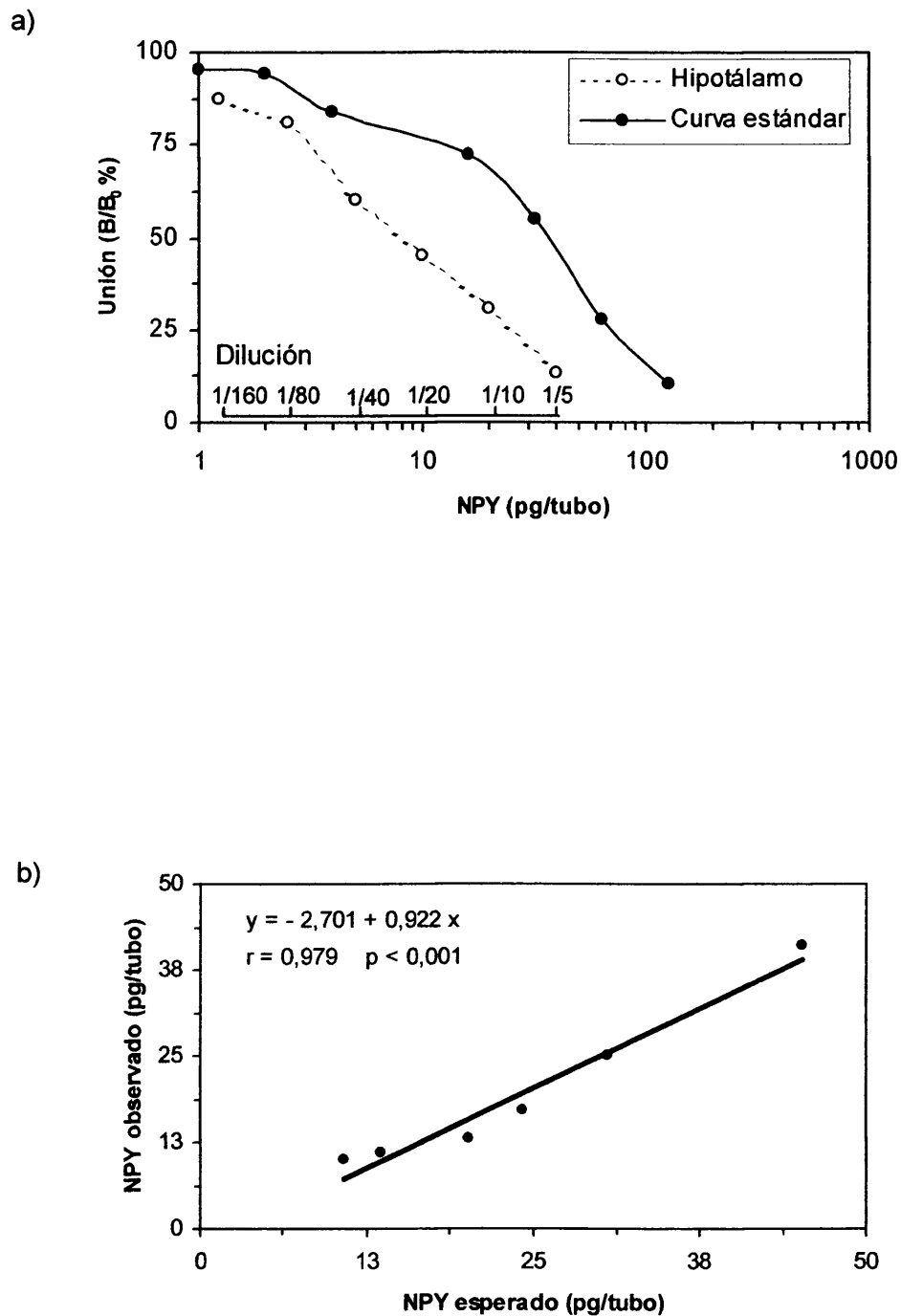
## 2. VALIDACIÓN DE LOS RIAs DE NPY, GHRELINA Y LEPTINA.

### 2.1. NPY.

Se realizó el paralelismo entre diluciones sucesivas de muestras de hipotálamo y telencéfalo de *Tinca tinca* y la curva estándar. Como puede observarse en la Figura 21a existe en ambos tejidos un marcado paralelismo, no encontrándose diferencias significativas entre las pendientes de las rectas obtenidas tras la transformación logit-log de los datos (curva estándar:  $b = -0,409 \pm 0,054$ ; diluciones de hipotálamo  $b = -0,518 \pm 0,052$ ,  $p > 0,1$ ).

Para la recuperación analítica, tras añadir cantidades conocidas de NPY a distintas muestras de hipotálamo se comparó la cantidad de neuropéptido encontrada con la esperada. Existe una correlación significativa entre la cantidad de NPY observada y la cantidad esperada (hipotálamo:  $r = 0,979$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 21b). La pendiente de la recta de regresión es significativamente distinta de 0 y próxima a 1 ( $b = 0,922$ ), lo que indica una relación aproximada de 1 a 1 entre la cantidad de neuropéptido estimada mediante RIA y la cantidad esperada. El porcentaje de recuperación medio es muy próximo al 100% (95,8%), lo que pone de manifiesto una buena recuperación analítica.

Para el cálculo de la variación intraensayo se usaron los coeficientes de variación de la unión específica (%) hallados para el  $B_0$  y para distintas concentraciones de NPY correspondientes al tramo alto, medio y bajo de la curva estándar y se compararon con los coeficientes de variación determinados a partir de muestras de hipotálamo y telencéfalo cuyo contenido de NPY fue similar a las concentraciones estándares utilizadas. La variación interensayo se calculó utilizando los coeficientes de variación de los mismos puntos estándares procedentes de 10 curvas estándares obtenidas en días diferentes. Como Cabría esperar, los coeficientes de variación intraensayo son inferiores a los interensayo (Tabla XII).



**Figura 21.** a) Paralelismo entre la curva estándar de NPY y diluciones sucesivas de homogenizado de hipotálamo de *T. tinca*. b) Eficacia analítica del RIA de NPY. Regresión lineal entre la cantidad de neuropéptido encontrada y la cantidad de neuropéptido esperada en muestras de hipotálamo de *T. tinca*, a las que se añadió una cantidad de NPY conocida. Los datos se representan como la media de dos determinaciones.

## 2.2. GHRELINA.

El paralelismo obtenido entre diluciones sucesivas de plasma de *Tinca tinca* y la curva estándar se muestra en la Figura 22a, no existiendo diferencias significativas entre las pendientes de las rectas obtenidas tras la transformación logit-log de los datos (curva estándar:  $b = -0,326 \pm 0,031$ ; diluciones de plasma:  $b = -0,335 \pm 0,025$ ,  $p > 0,7$ ).

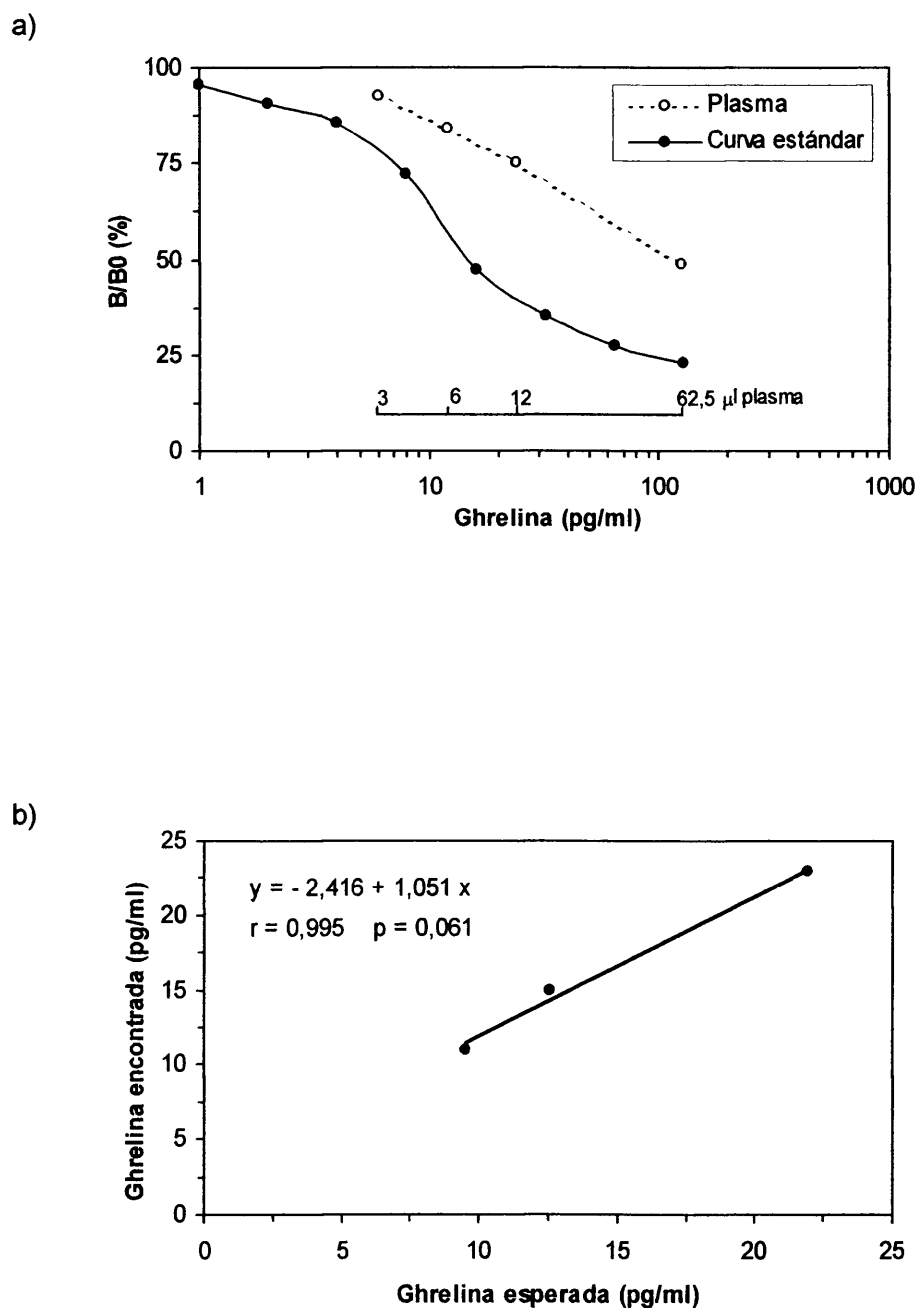
Para la recuperación analítica se añadieron cantidades conocidas de ghrelina a distintas muestras de plasma y se comparó la cantidad de hormona encontrada con la esperada. Aunque la correlación entre la cantidad de ghrelina observada y la cantidad esperada no llegó a ser estadísticamente significativa ( $p = 0,06$ ) (Figura 22b), el elevado coeficiente de correlación ( $r = 0,995$ ) pone de manifiesto una buena correlación entre ambos parámetros. La pendiente de la recta de regresión es 1,051, lo que indica una relación aproximada de 1 a 1 entre la cantidad de hormona estimada mediante RIA y la cantidad esperada. El porcentaje de recuperación medio fue del 90%, lo que pone de manifiesto una buena recuperación analítica.

Para el cálculo de la variación intraensayo se usaron los coeficientes de variación de la unión específica (%) hallados para el  $B_0$  y para distintas concentraciones de ghrelina correspondientes al tramo alto, medio y bajo de la curva estándar. La variación interensayo se calculó utilizando los coeficientes de variación de los mismos puntos estándares procedentes de 9 curvas estándares obtenidos en días diferentes. Los coeficientes de variación hallados a partir de la curva estándar se compararon con los coeficientes de variación determinados a partir de muestras de plasma cuyo contenido de ghrelina fue similar a las concentraciones estándares utilizadas (Tabla XIII). Los coeficientes de variación intraensayo (próximos al 10%) son menores que los interensayo (cercaos al 20%), lo que indica una elevada reproducibilidad del RIA empleado.

## 2.3. LEPTINA.

Dado que el “kit” comercial para la valoración de leptina utilizado en la presente Memoria (“Leptin Multi-species” RIA, 71430, Linco Research, Inc.) permite la determinación de esta hormona en 250 tubos, y que además en cada ensayo se utilizó la mitad del volumen recomendado por la casa comercial, solamente fue necesario realizar cuatro ensayos para el análisis completo de las muestras. Esto impuso ciertas limitaciones a la hora de realizar la validación de este método, como por ejemplo, un tamaño muestral reducido para el análisis de algunos de los criterios de validez.

El análisis del paralelismo no pudo realizarse mediante la dilución sucesiva de las muestras dado que la concentración de leptina en éstas se encuentra en la zona baja de



**Figura 22.** a) Paralelismo entre la curva estándar de ghrelina y diluciones sucesivas de plasma de *T. tinca*. Los datos se representan como la media de dos determinaciones. b) Eficacia analítica del RIA de ghrelina. Regresión lineal entre la cantidad de hormona encontrada y la cantidad de hormona esperada en muestras de plasma de *T. tinca* a las que se añadió una cantidad de ghrelina conocida. Los datos se representan como la media de dos determinaciones.

**Tabla XII.** Comparación de los coeficientes de variación intra- e interensayo del RIA de NPY calculados a partir de las curvas estándares y de muestras de hipotálamo de la tenca (*Tinca tinca*).

Curva estándar			Hipotálamo	
	CV (%)			CV (%)
pg/tubo	Intra- (n = 7)	Inter- (n = 10)	pg/tubo	Intra-(n = 6)
0 (B <sub>0</sub> )	5,04	11,98	46,43	5,88
2	9,49	4,34	74,49	4,99
16	11,75	15,64	110,90	6,95
32	16,02	25,50		

CV: coeficiente de variación.

**Tabla XIII.** Comparación de los coeficientes de variación intra- e interensayo del RIA de ghrelina calculados a partir de las curvas estándares y de muestras de plasma de la tenca (*Tinca tinca*).

Curva estándar			Plasma	
	CV (%)			CV (%)
pg/tubo	Intra- (n = 9)	Inter- (n = 10)	pg/tubo	Intra- (n = 8)
0 (B <sub>0</sub> )	10,94	15,28	---	---
8	10,14	12,93	10,31	8,47
16	8,02	19,16	16,19	7,01
32	10,82	16,28	30,89	9,61

CV: coeficiente de variación.

la curva, próxima a la concentración del estándar más bajo (1 pg/ml), por lo que la concentración en éstas diluciones está por debajo del límite de sensibilidad de este RIA. Sin embargo, como primera aproximación, se incrementó el volumen de muestra (con las limitaciones que esto conlleva respecto al mantenimiento de las proporciones relativas de los distintos componentes del ensayo) hallando el doble de la concentración de hormona cuando se duplicó el volumen de muestra.

Se calcularon además los coeficientes de variación intraensayo para el  $B_0$  y muestras de plasma, siendo de 2,7 % en el primer caso y entre 2,8 y 6,3 % en el caso de las muestras. Los coeficientes de variación interensayo no se determinaron debido a que el número de ensayos realizados fue muy bajo (4 ensayos) y consideramos que un tamaño muestral de 4 para el análisis de la reproducibilidad del método no es suficientemente elevado para ser representativo.

Por último, el análisis de la eficacia del ensayo, que se realizó añadiendo cantidades conocidas de leptina a distintas muestras de plasma y comparando la cantidad de hormona encontrada con la esperada mostró un porcentaje de recuperación medio muy próximo al 100% (96,6%), lo que pone de manifiesto una buena recuperación analítica.

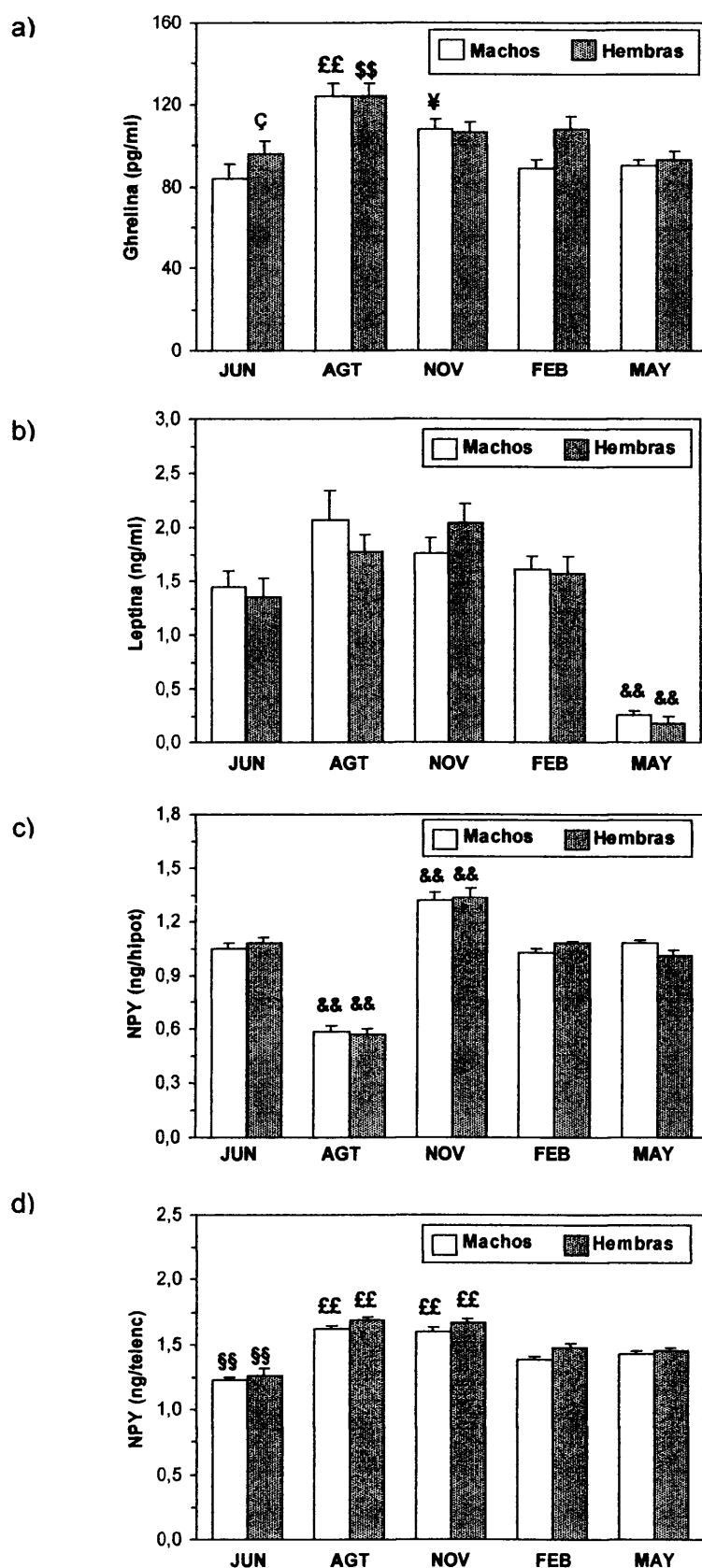
### **3. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN EL CONTENIDO HIPOTALÁMICO Y TELENCEFÁLICO DE NPY Y EN LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LEPTINA Y GHRELINA EN *Tinca tinca*.**

En la Figura 23 se representan los niveles medios circulantes de ghrelina (a) y leptina (b) y el contenido hipotalámico (c) y telencefálico (d) de NPY en 5 momentos distintos del año. El perfil anual de los niveles plasmáticos de ghrelina es similar en ambos sexos, observándose los valores más altos en agosto y noviembre ( $p < 0,01$  respecto a los otros puntos de muestreo). Los niveles circulantes de leptina muestran un perfil anual similar en machos y hembras, con los valores mínimos en mayo respecto al resto de los puntos de muestreo ( $p < 0,01$ ). El patrón estacional del contenido hipotalámico de NPY es idéntico en ambos sexos, con el menor contenido en agosto ( $p < 0,01$  respecto al resto de los puntos de muestreo) y el más alto en noviembre ( $p < 0,01$  respecto al resto de los puntos de muestreo). Las variaciones anuales del contenido telencefálico de NPY son similares en machos y hembras, y muestran valores elevados en agosto y noviembre ( $p < 0,01$  respecto a junio, febrero y mayo) y el menor contenido en junio ( $p < 0,01$  respecto a febrero y mayo), no existiendo diferencias entre invierno y primavera.

En la Tabla XIV se presentan los coeficientes de correlación ( $r$ ) y los valores de la significación estadística ( $p$ ) para las correlaciones que se establecen entre los niveles plasmáticos de ghrelina y leptina, el contenido hipotalámico y telencefálico de NPY con el peso corporal, hepático, gonadal y de la grasa perivisceral en machos y hembras de tenca. En los machos la concentración circulante de ghrelina muestra una correlación significativa positiva con las concentraciones circulantes de leptina y con el contenido telencefálico de NPY, mientras que se correlaciona negativamente con el contenido hipotalámico de este neuropéptido y con el peso del hígado. Las concentraciones plasmáticas de leptina se correlacionan de forma positiva con el peso de la grasa perivisceral. El NPY hipotalámico presenta una correlación significativa de signo negativo con el índice nutricional, mientras que el contenido telencefálico de NPY se correlaciona negativamente tanto con el índice nutricional como con el peso corporal, hepático, gonadal y de la grasa perivisceral. En las hembras las concentraciones plasmáticas de ghrelina se correlacionan negativamente con el contenido hipotalámico de NPY. Las concentraciones circulantes de leptina muestran una correlación negativa con el peso corporal, hepático y gonadal. Como en el caso de los machos, el contenido telencefálico de NPY presenta una correlación significativa de signo negativo tanto con el índice nutricional como con el peso corporal, hepático, gonadal y de la grasa perivisceral.

En la Tabla XV se muestran los parámetros que definen las funciones sinusoidales del ajuste a los valores experimentales de los ritmos diarios de los niveles circulantes de ghrelina y leptina y el contenido hipotalámico y telencefálico de NPY en cinco momentos diferentes del año, correspondientes al solsticio de verano, verano, otoño, invierno y primavera. Los niveles plasmáticos de ghrelina (Figura 24) únicamente mostraron un ritmo diario estadísticamente significativo en junio (ruido/señal = 0,28), con la acrofase aproximadamente a las 4:30 de la mañana. La amplitud máxima se observó en junio ( $27,09 \pm 7,55$  pg/ml), momento a partir del cual la amplitud va disminuyendo progresivamente hasta alcanzar el mínimo en febrero-mayo (aproximadamente 1,40 pg/ml). El nivel medio más elevado se registró en agosto.

Las concentraciones circulantes de leptina (Figura 24) no siguen un ritmo estadísticamente significativo en ninguno de los puntos de muestreo (ruido/señal >0,3). El valor medio más elevado se halló en noviembre ( $2,08 \pm 0,14$  ng/ml), mientras que el más bajo se observó en mayo ( $0,60 \pm 0,15$  ng/ml), momento del año en el que se registró la mayor amplitud ( $0,52 \pm 0,20$  ng/ml).



**Figura 23.** Cambios anuales en los niveles plasmáticos de ghrelina (a) y leptina (b) y en el contenido hipotalámico (c) y telencefálico (d) de NPY en tencas adultas de ambos sexos. Los datos representan la media  $\pm$  e.e.m. ( $n = 32$ /grupo). ££  $p < 0,01$  respecto a junio, febrero y mayo; ¥  $p < 0,05$  respecto a junio; \$\$  $p < 0,01$  respecto a mayo; Ç  $p < 0,05$  respecto a agosto; ##:  $p < 0,05$  respecto a agosto; &&  $p < 0,01$  respecto al resto de los puntos de muestreo. ££  $p < 0,01$  respecto a junio, febrero y mayo; \$\$  $p < 0,01$  respecto a febrero y mayo.



**Tabla XIV.** Coeficientes de correlación (*r*) y valores *p* de las relaciones entre los niveles plasmáticos de ghrelina y leptina, el contenido hipotalámico y telencefálico de NPY con el peso corporal, el índice nutricional y el peso de hígado, gónadas y grasa perivisceral en la tenca (*Tinca tinca*).

			Leptina (ng/ml)	NPY (ng/hipot)	NPY (ng/telenc)	Peso corporal (g)	IN (g/cm <sup>3</sup> )	P. hígado (g)	P. gónada (g)	P. grasa (g)
MACHOS	Ghrelina (pg/ml)	<i>r</i>	0,325	-0,176	0,239	-0,044	0,004	-0,211	-0,042	0,115
		<i>P</i>	0,001	0,023	0,002	0,565	0,957	0,005	0,586	0,132
	Leptina (ng/ml)	<i>r</i>	----	-0,095	0,018	-0,002	0,012	-0,078	0,026	0,230
		<i>P</i>	----	0,343	0,857	0,982	0,904	0,429	0,793	0,019
	NPY (ng/hipot)	<i>r</i>	----	----	-0,080	0,121	-0,150	0,104	0,122	-0,004
		<i>P</i>	----	----	0,295	0,101	0,043	0,158	0,115	0,958
	NPY (ng/telenc)	<i>r</i>	----	----	----	-0,375	-0,398	-0,300	-0,412	-0,206
		<i>P</i>	----	----	----	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,006
HEMBRAS	Ghrelina (pg/ml)	<i>r</i>	0,158	-0,181	0,084	0,076	0,043	-0,075	0,002	0,150
		<i>P</i>	0,121	0,034	0,327	0,350	0,603	0,360	0,982	0,067
	Leptina (ng/ml)	<i>r</i>	----	0,063	0,125	-0,222	-0,085	-0,257	-0,231	0,062
		<i>P</i>	----	0,543	0,235	0,024	0,393	0,009	0,019	0,537
	NPY (ng/hipot)	<i>r</i>	----	----	-0,141	0,043	-0,068	-0,072	0,007	0,037
		<i>P</i>	----	----	0,100	0,061	0,413	0,381	0,929	0,066
	NPY (ng/telenc)	<i>r</i>	----	----	----	-0,431	-0,335	-0,429	-0,435	-0,290
		<i>P</i>	----	----	----	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

IN: Índice nutricional; P. hígado: Peso del hígado, P. gónada: Peso de la gónada, P. grasa: Peso de la grasa perivisceral. NPY: Neuropeptido Y. (machos: n = 196, hembras: n = 165). En negrita se muestran las correlaciones estadísticamente significativas.

El contenido hipotalámico de NPY (Figura 25) siguió un ritmo diario significativo en agosto (ruido/señal = 0,14) y noviembre (ruido/señal = 0,23), mientras que en los tres puntos de muestreo restantes el contenido de NPY no mostró oscilaciones cíclicas. El ritmo fue más marcado en verano que en otoño, como muestra el mayor cociente máx/mín registrado en agosto (1,86 en verano y 1,35 en otoño). En verano, la acrofase se alcanza en la primera mitad de la fase luminosa, mientras que en otoño los valores máximos aparecen en la segunda mitad de la escotofase. Los valores medios de NPY en mayo, junio y febrero fueron muy similares (próximos a 1 ng/hipot). El mésor más elevado se halló en noviembre (aproximadamente 1,32 ng/hipot), mientras que el más bajo se registró en agosto (0,57 ng/hipot).

El contenido de NPY en el telencéfalo (Figura 25) no se ajusta de forma significativa a un ritmo diario en ninguna de las épocas del año estudiadas. Los valores medios son ligeramente más elevados en agosto y noviembre (aproximadamente 1,65 ng/telenc), mientras que los más bajos se hallaron en junio ( $1,24 \pm 0,03$  ng/telenc).

#### **4. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN EL CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE MONOAMINAS EN *Tinca tinca*.**

En la Figura 26 se muestra un cromatograma tipo de una solución de estándares conteniendo HMPG, NA, A, DOPAC, 5-HIAA, DA y 5-HT y el estándar interno ISO a una concentración 100 nM. Las condiciones cromatográficas se especifican en el apartado 2.6.3. de Materiales y Métodos. Los tiempos de retención de cada uno de los compuestos se muestran en la Tabla XVI.

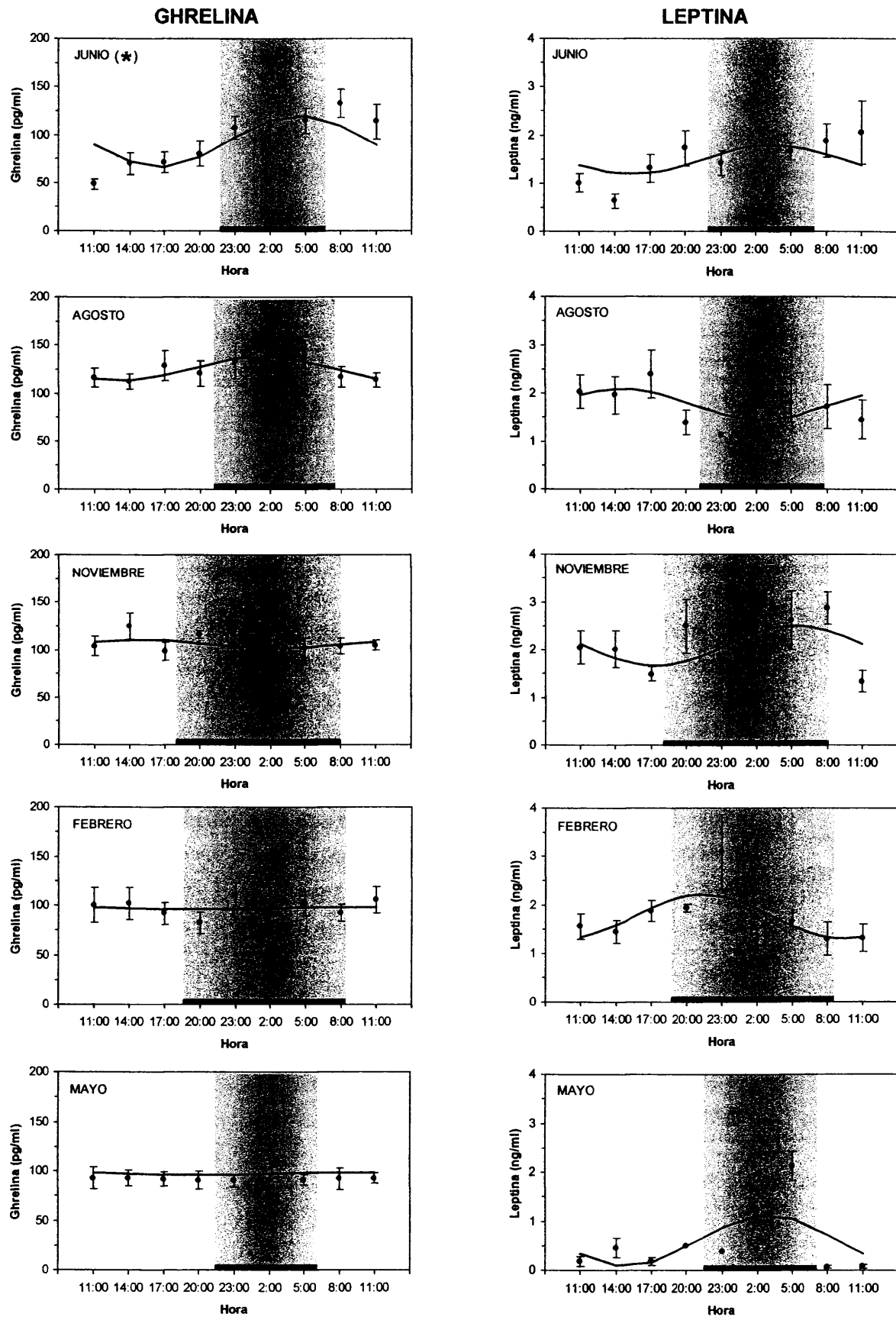
En La Figura 27 puede observarse el perfil estacional del contenido de NA, HMPG DA, DOPAC y de los cocientes metabolito/monoamina en tencas adultas de ambos sexos. El contenido hipotalámico de NA mostró variaciones anuales similares en ambos sexos, con los valores más altos en verano y los más bajos en las estaciones frías. Sólo se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos en primavera ( $p < 0,05$ ), siendo mayor en el caso de las hembras. El contenido de HMPG muestra una drástica reducción en invierno en ambos sexos, disminuyendo hasta alcanzar valores no detectables, lo que se refleja en una marcada reducción del cociente HMPG/NA en esta estación.

El contenido hipotalámico de DA mostró valores ligeramente más bajos en febrero y mayo respecto a las otras dos estaciones. Las variaciones estacionales de DOPAC son similares en ambos sexos, con valores elevados en agosto ( $p < 0,01$  respecto al resto de los meses muestreados), y disminuyendo en noviembre ( $p < 0,01$  respecto a febrero y

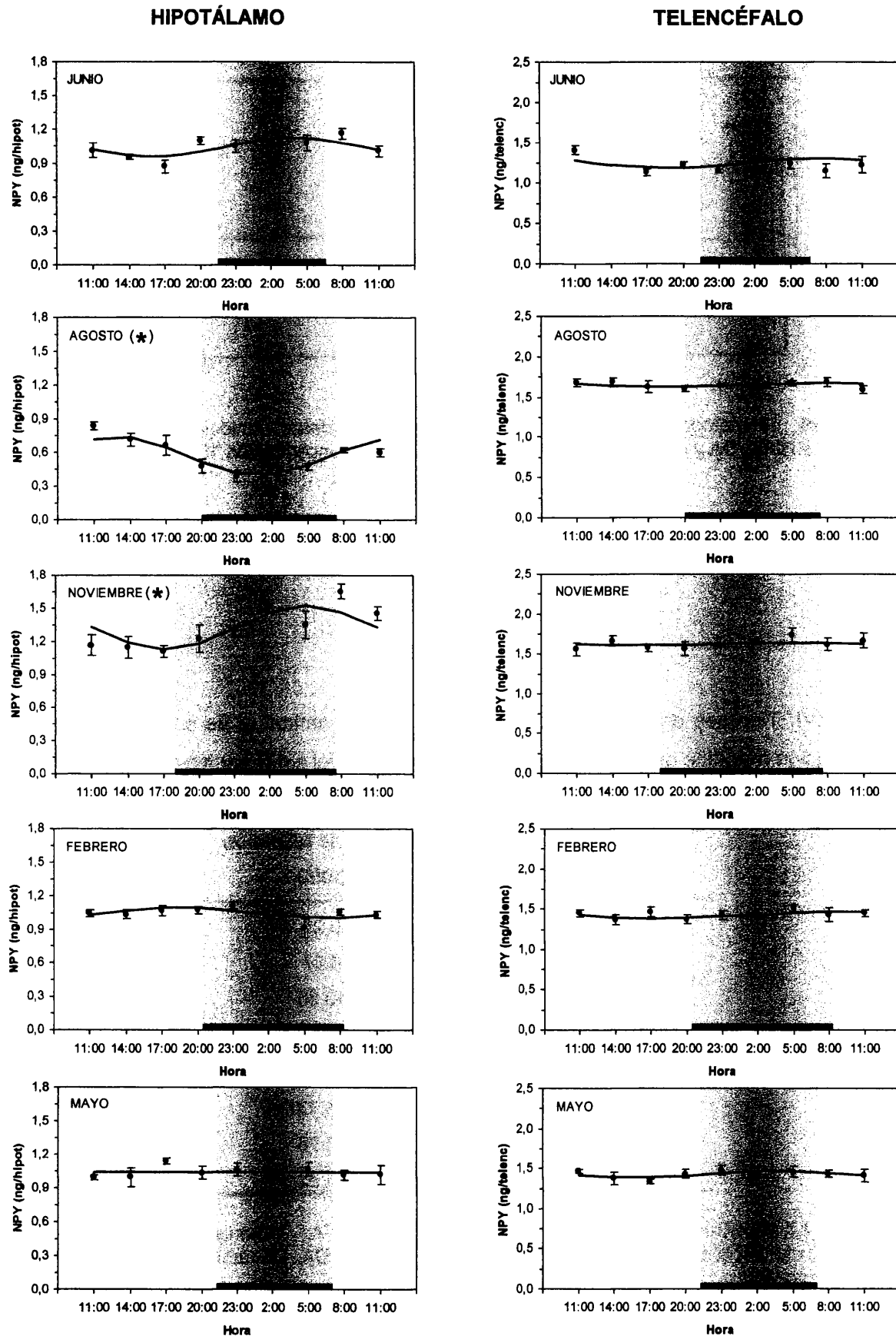
**Tabla XV.** Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas de los ritmos diarios del contenido hipotalámico y telencefálico de NPY y en los niveles circulantes de ghrelina y leptina a lo largo del año en la tenca (*Tinca tinca*).

	Estación	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	φ	Máx/mín	Ruido/señal
<b>Ghrelina</b> (pg/ml)	<b>24-06-02</b>	<b>93,54 ± 5,14</b>	<b>27,09 ± 7,55</b>	<b>04:26 ± 0,59</b>	<b>1,82</b>	<b>0,28*</b>
	18-08-02	125,79 ± 4,38	12,47 ± 6,12	01:16 ± 1,18	1,22	0,49
	07-11-02	105,90 ± 3,25	4,73 ± 4,58	14:44 ± 2,22	1,09	0,57
	05-02-03	97,17 ± 4,14	1,36 ± 5,71	08:59 ± 10,12	1,03	4,19
	08-05-03	91,38 ± 2,44	1,40 ± 3,35	12:16 ± 5,81	1,03	2,40
<b>Leptina</b> (ng/ml)	<b>24-06-02</b>	<b>1,49 ± 0,13</b>	<b>0,30 ± 0,19</b>	<b>03:27 ± 1,28</b>	<b>1,49</b>	<b>0,65</b>
	18-08-02	1,76 ± 0,15	0,33 ± 0,20	14:32 ± 1,51	1,46	0,61
	07-11-02	2,08 ± 0,14	0,42 ± 0,21	05:21 ± 1,05	1,50	0,50
	05-02-03	1,75 ± 0,11	0,46 ± 0,16	21:25 ± 0,78	1,71	0,34
	08-05-03	0,60 ± 0,15	0,52 ± 0,20	02:52 ± 0,91	13,58	0,39
<b>NPY</b> (ng/hipot)	<b>24-06-02</b>	<b>1,04 ± 0,02</b>	<b>0,09 ± 0,27</b>	<b>03:56 ± 0,69</b>	<b>1,18</b>	<b>0,32</b>
	18-08-02	<b>0,57 ± 0,02</b>	<b>0,17 ± 0,02</b>	<b>12:48 ± 0,34</b>	<b>1,86</b>	<b>0,14*</b>
	07-11-02	<b>1,32 ± 0,03</b>	<b>0,20 ± 0,05</b>	<b>05:08 ± 0,48</b>	<b>1,35</b>	<b>0,23*</b>
	05-02-03	1,05 ± 0,02	0,04 ± 0,03	18:36 ± 1,17	1,09	0,53
	08-05-03	1,04 ± 0,02	0,001 ± 0,03	14:15 ± 52,39	1,00	20,46
<b>NPY</b> (ng/telenc)	<b>24-06-02</b>	<b>1,24 ± 0,03</b>	<b>0,06 ± 0,35</b>	<b>07:52 ± 1,48</b>	<b>1,10</b>	<b>0,59</b>
	18-08-02	1,65 ± 0,02	0,02 ± 0,02	06:58 ± 2,21	1,03	1,02
	07-11-02	1,63 ± 0,02	0,02 ± 0,04	04:29 ± 4,66	1,02	2,27
	05-02-03	1,42 ± 0,02	0,05 ± 0,03	05:22 ± 1,47	1,07	0,64
	08-05-03	1,34 ± 0,01	0,04 ± 0,02	03:58 ± 1,13	1,06	0,55

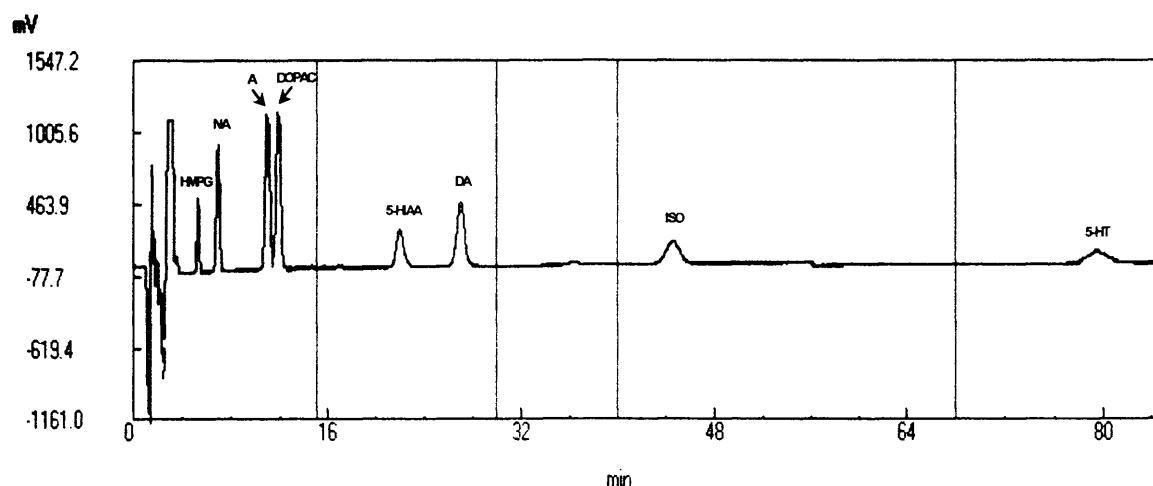
\* El ritmo es significativo (ruido/señal < 0,3), en negrita. Los datos se representan como media ± e.e.m. A<sub>0</sub>: Nivel medio o mésor, A<sub>1</sub>: Amplitud sinusoidal, φ: Fase.



**Figura 24.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias de los niveles plasmáticos de ghrelina y leptina en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n=8$ /hora de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.



**Figura 25.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del contenido hipotalámico y telencefálico de NPY en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 8/\text{hora de muestreo}$ ). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.

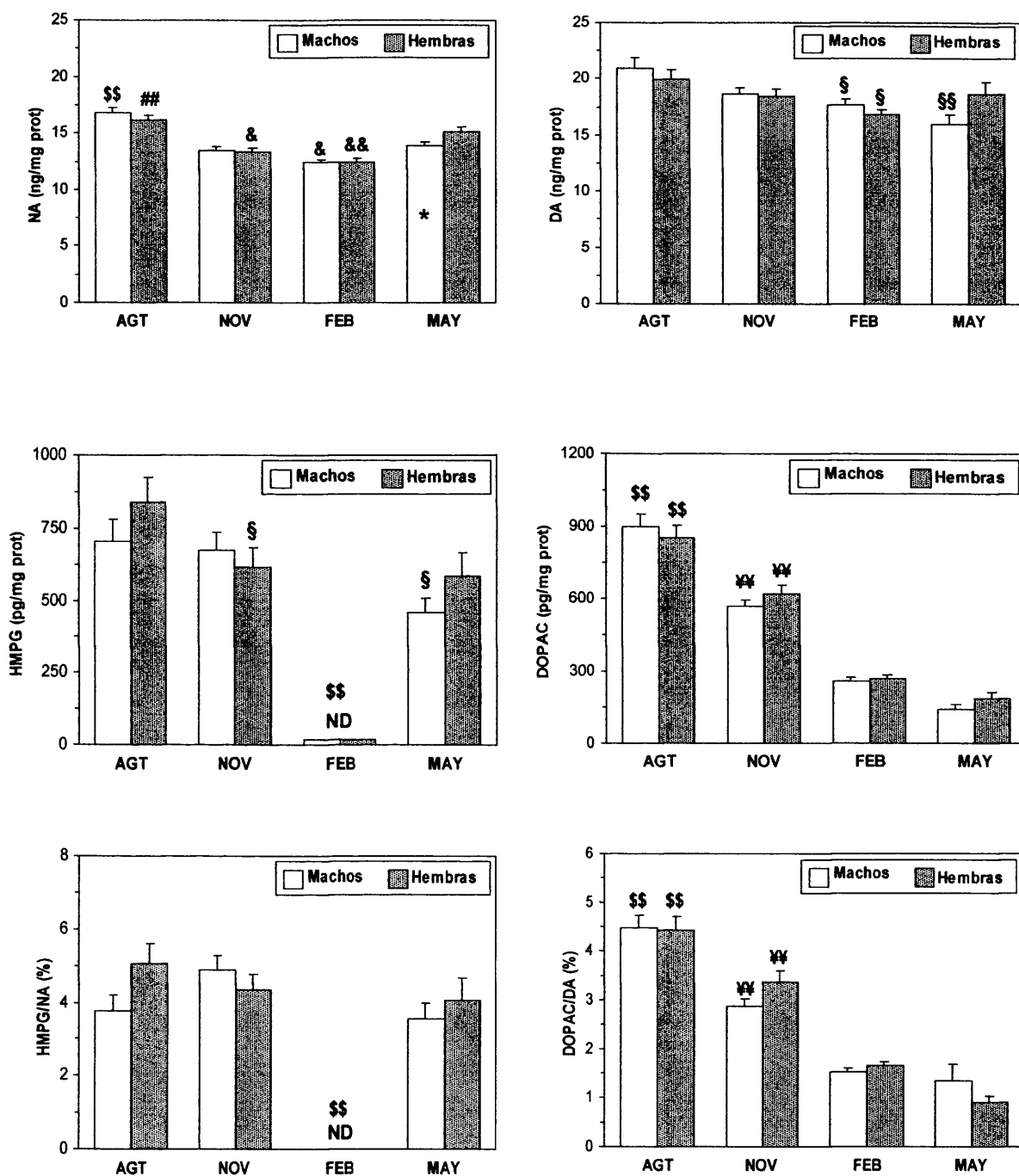


**Figura 26.** Cromatograma tipo de una solución de estándares conteniendo HMPG, NA, A, DOPAC, 5-HIAA, DA y 5-HT y el estándar interno ISO a una concentración 100 nM.

**Tabla XVI.** Tiempos de retención de las distintas monoaminas y de sus metabolitos de degradación medidos en el hipotálamo de *Tinca tinca* y del estándar interno.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
HMPG	5,25
NA	6,87
A	10,85
DOPAC	11,18
5-HIAA	21,15
DA	25,73
ISO	42,76
5-HT	76,22

HMPG: 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol, NA: Noradrenalina, A: Adrenalina, DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxiifenilacético, 5-HIAA: Ácido 5-hidroxindol acético, DA: Dopamina, ISO: Isoproterenol, 5-HT: Serotonina.



**Figura 27.** Cambios anuales en el contenido hipotalámico de NA y DA, sus metabolitos (HMPG y DOPAC, respectivamente) y la relación de ambos con sus correspondientes aminas en tencas adultas de ambos sexos. Los datos representan la media  $\pm$  e.e.m. ( $n = 32/\text{grupo}$ ). \$\$  $p < 0,01$  respecto al resto de los meses muestreados; ##  $p < 0,01$  respecto a noviembre y febrero; &&  $p < 0,01$ , &  $p < 0,05$  respecto a mayo; \$\$  $p < 0,01$ , \$  $p < 0,05$  respecto a agosto; ££  $p < 0,01$  respecto a noviembre y mayo; ¥¥  $p < 0,01$  respecto a febrero y mayo. \*  $p < 0,05$  machos respecto a hembras.

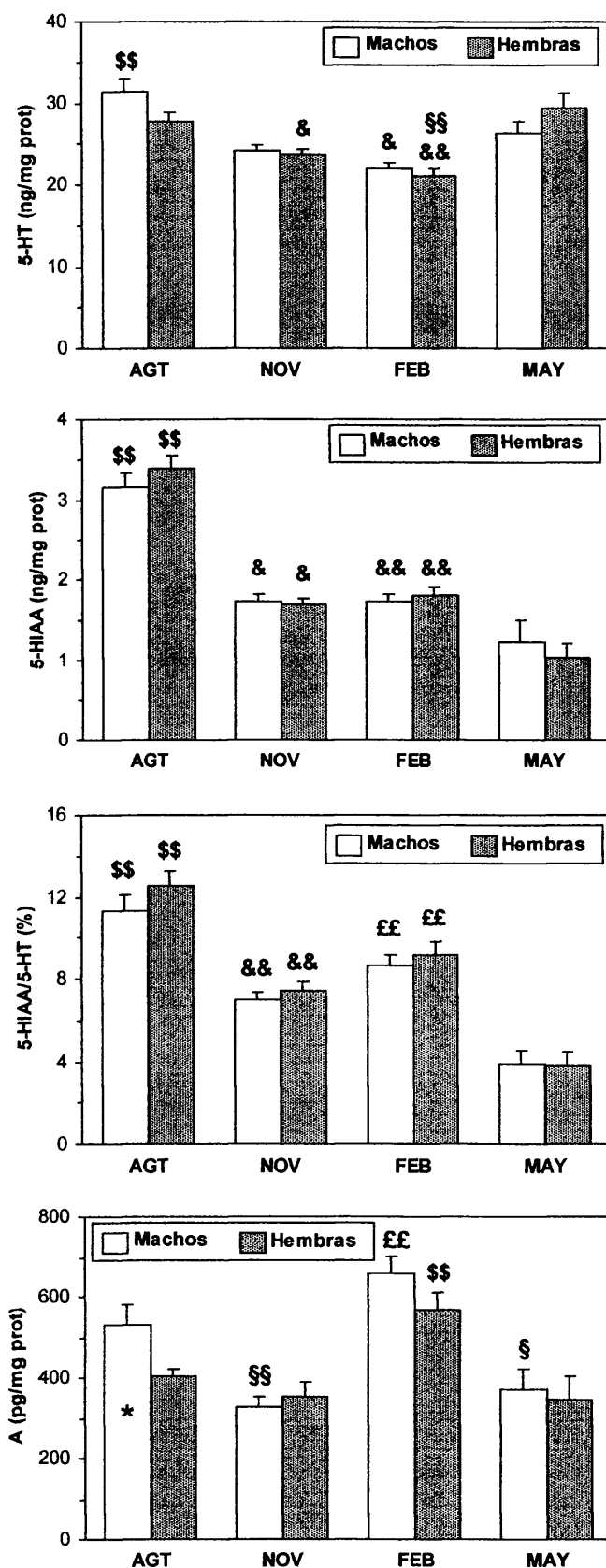
mayo), para alcanzar los niveles mínimos en febrero y mayo. La relación DOPAC/DA mostró un patrón anual muy similar al del DOPAC tanto en machos como en hembras.

La 5-HT hipotalámica en la tenca varía de forma significativa a lo largo del ciclo anual, con los niveles menores en noviembre y febrero y valores más altos en mayo y agosto (Figura 28). Las variaciones anuales del contenido hipotalámico de 5-HIAA (Figura 28) son similares en ambos sexos presentando los valores máximos en agosto ( $p < 0,01$  respecto al resto de los meses de muestreo) y los mínimos en mayo, sin diferencias significativas entre los meses fríos (noviembre y febrero). El cociente 5-HIAA/5-HT (Figura 28) mostró los valores máximos en agosto ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones), disminuye en noviembre ( $p < 0,01$  respecto a mayo) para aumentar de nuevo en febrero ( $p < 0,01$  respecto a noviembre y mayo) y disminuir finalmente en mayo, mes en el que se registró el mínimo.

La A hipotalámica mostró un perfil anual similar en ambos sexos, salvo en agosto, cuando el contenido de A en los machos fue mayor que en las hembras ( $p < 0,05$ ) (Figura 28). El contenido de A no mostró grandes variaciones anuales, salvo en febrero, cuando los valores son significativamente superiores al resto del año ( $p < 0,01$  respecto a otoño y primavera), y niveles similares en otoño y primavera. En las hembras, se halló un único pico en febrero ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones), mientras que en el resto de los puntos de muestreo el contenido hipotalámico de A fue similar.

En la Tabla XVII se presentan los coeficientes de correlación ( $r$ ) y los valores de la significación estadística ( $p$ ) para las correlaciones que se establecen entre el contenido hipotalámico de las distintas monoaminas y con el peso corporal, el índice nutricional y el peso de hígado, gónadas y grasa perivisceral en machos y hembras de tenca. En los machos la NA mostró correlaciones estadísticamente significativas y positivas con la DA y la 5-HT y con el IN y el peso de la grasa perivisceral, mientras que la correlación con el peso hepático fue negativa. Por su parte, la DA se correlacionó positivamente con la 5-HT y el peso de la grasa perivisceral, y negativamente con el peso del hígado. La A no mostró correlaciones con ninguna de las demás monoaminas ni con ninguno de los restantes parámetros estudiados. Finalmente, la 5-HT solo se correlacionó positivamente con el IN. En las hembras la NA se correlacionó positivamente con la DA y la 5-HT, así como con el IN y con el peso de las gónadas. La DA solo mostró una correlación estadísticamente significativa con la 5-HT, que fue de signo positivo. Por su parte, la A presentó una correlación negativa con el contenido hipotalámico de 5-HT. Por último la 5-HT únicamente se correlacionó con el IN, siendo esta correlación de signo positivo.





**Figura 28.** Cambios anuales en el contenido hipotalámico de 5-HT, su metabolito (5-HIAA) y la relación entre metabolito y amina, así como de A. Los datos representan la media  $\pm$  e.e.m. (n= 32/grupo). \$\$ p < 0,01 respecto al resto; && p < 0,01, & p < 0,05 respecto a mayo; \$\$ p < 0,01, \$ p < 0,05 respecto a agosto; ££ p < 0,01 respecto a noviembre y mayo. \* p < 0,05 machos respecto a hembras.

Tabla XVII. Coeficientes de correlación ( $r$ ) y valor  $p$  de las relaciones entre el contenido hipotalámico de monoaminas y los niveles plasmáticos de ghrelina y leptina, y el contenido hipotalámico y telencefálico de NPY en machos y hembras de tenca (*Tinca tinca*).

			DA (ng/mg prot)	A (pg/mg prot)	5-HT (ng/mg prot)	Peso corporal (g)	IN (g/cm <sup>3</sup> )	P. hígado (g)	P. gónada (g)	P. grasa (g)
MACHOS	NA (ng/mg prot)	$r$	0,378	-0,093	0,381	-0,115	0,316	-0,191	0,003	0,196
		$p$	< 0,001	0,324	< 0,001	0,183	< 0,001	0,027	0,720	0,025
	DA (ng/mg prot)	$r$	---	-0,050	0,770	-0,110	0,018	-0,188	-0,048	0,177
		$p$	---	0,597	< 0,001	0,210	0,836	0,031	0,596	0,045
	A (pg/mg prot)	$r$	---	---	0,052	0,008	0,021	0,068	-0,146	-0,042
		$p$	---	---	0,576	0,927	0,812	0,444	0,106	0,639
	5-HT (ng/mg prot)	$r$	---	---	---	0,014	0,184	-0,006	0,133	0,118
		$p$	---	---	---	0,875	0,032	0,946	0,129	0,177
HEMBRAS	NA (ng/mg prot)	$r$	0,436	-0,046	0,513	-0,051	0,358	0,036	0,306	0,058
		$p$	< 0,001	0,644	< 0,001	0,589	< 0,001	0,708	< 0,001	0,545
	DA (ng/mg prot)	$r$	---	-0,097	0,766	-0,091	0,143	-0,064	-0,031	0,075
		$p$	---	0,327	< 0,001	0,332	0,128	0,370	0,746	0,430
	A (pg/mg prot)	$r$	---	---	-0,301	-0,010	-0,022	-0,075	-0,009	0,010
		$p$	---	---	0,002	0,917	0,814	0,430	0,921	0,919
	5-HT (ng/mg prot)	$r$	---	---	---	-0,026	0,232	0,123	0,148	0,025
		$p$	---	---	---	0,784	0,012	0,190	0,112	0,796

NA: Noradrenalina, DA: Dopamina, A: Adrenalina, 5-HT: Serotonina, IN: Índice nutricional; P. hígado: Peso del hígado, P. gónada: Peso de la gónada, P: grasa: Peso de la grasa perivisceral. (machos:  $n = 196$ , hembras:  $n = 165$ ). En negrita se muestran las correlaciones estadísticamente significativas.

Los coeficientes de correlación ( $r$ ) y los valores de la significación estadística ( $p$ ) para las correlaciones que se establecen entre el contenido hipotalámico de las distintas monoaminas con los niveles plasmáticos de ghrelina y leptina y el contenido hipotalámico y telencefálico de NPY en tencas de ambos sexos se presentan en la Tabla XVIII. En los machos, la NA se correlacionó de forma significativa y positiva con los niveles circulantes de ghrelina y leptina, así como con el contenido telencefálico de NPY. Esta catecolamina presentó además una correlación negativa con el contenido hipotalámico de NPY. La DA se correlacionó positivamente con la ghrelina circulante y el NPY telencefálico, mientras que la correlación con el NPY hipotalámico fue de signo negativo. La adrenalina no mostró correlaciones ni con el contenido hipotalámico y telencefálico de NPY, ni con los niveles de hormonas circulantes. Por último, la 5-HT hipotalámica se correlacionó significativa y positivamente con la ghrelina y la leptina plasmáticas, y negativamente con el contenido de NPY en el hipotálamo. En las hembras, mientras que la NA presentó una correlación significativa con el NPY, siendo esta correlación de signo negativo para el NPY hipotalámico y positivo para el NPY telencefálico, ni DA ni A se correlacionaron con ninguno de los neuropéptidos y hormonas analizados. Por su parte, la 5-HT mostró una correlación de signo negativo con el contenido hipotalámico de NPY.

En la Tabla XIX se presentan los parámetros que definen las funciones sinusoidales del ajuste a los valores experimentales del ritmo diario del contenido hipotalámico de monoaminas y sus metabolitos en las cuatro estaciones del año. Ninguna de las monoaminas estudiadas siguió un ritmo diario estadísticamente significativo (Figuras 29-32). El contenido hipotalámico de HMPG presentó un ritmo diario estadísticamente significativo en verano (ruido/señal = 0,18) (Figura 29), estación en la que se registraron el nivel medio y la amplitud más altos. El DOPAC mostró oscilaciones a lo largo del fotociclo que se ajustan a un ritmo estadísticamente significativo (ruido/señal = 0,21) únicamente en agosto, con la acrofase en la primera mitad de la fase oscura (Figura 30), mes en el que se registró el mésar más elevado (886,08 pg/mg prot), así como la amplitud más alta (213,95 pg/mg prot) de todo el año.

En la Tabla XX se muestran estos mismos parámetros para los cocientes metabolito/monoamina en las cuatro estaciones del año. Las oscilaciones diarias de la relación HMPG/NA (Figura 33) se ajustan a un ritmo estadísticamente significativo en agosto y en mayo (sólo las hembras), con la acrofase aproximadamente a las 14:00 h en ambos meses, si bien el ritmo fue más marcado en primavera (máx/mín = 6,26) que en verano (máx/mín = 3,41). El cociente DOPAC/DA (Figura 34) mostró el mésar más elevado en agosto (4,55), y el mínimo en mayo (0,99), siguiendo un ritmo

**Tabla XVIII.** Coeficientes de correlación (*r*) y valor *p* de las relaciones entre el contenido hipotalámico de monoaminas y los niveles plasmáticos de ghrelina y leptina, y el contenido hipotalámico y telencefálico de NPY en machos y hembras de tenca (*Tinca tinca*).

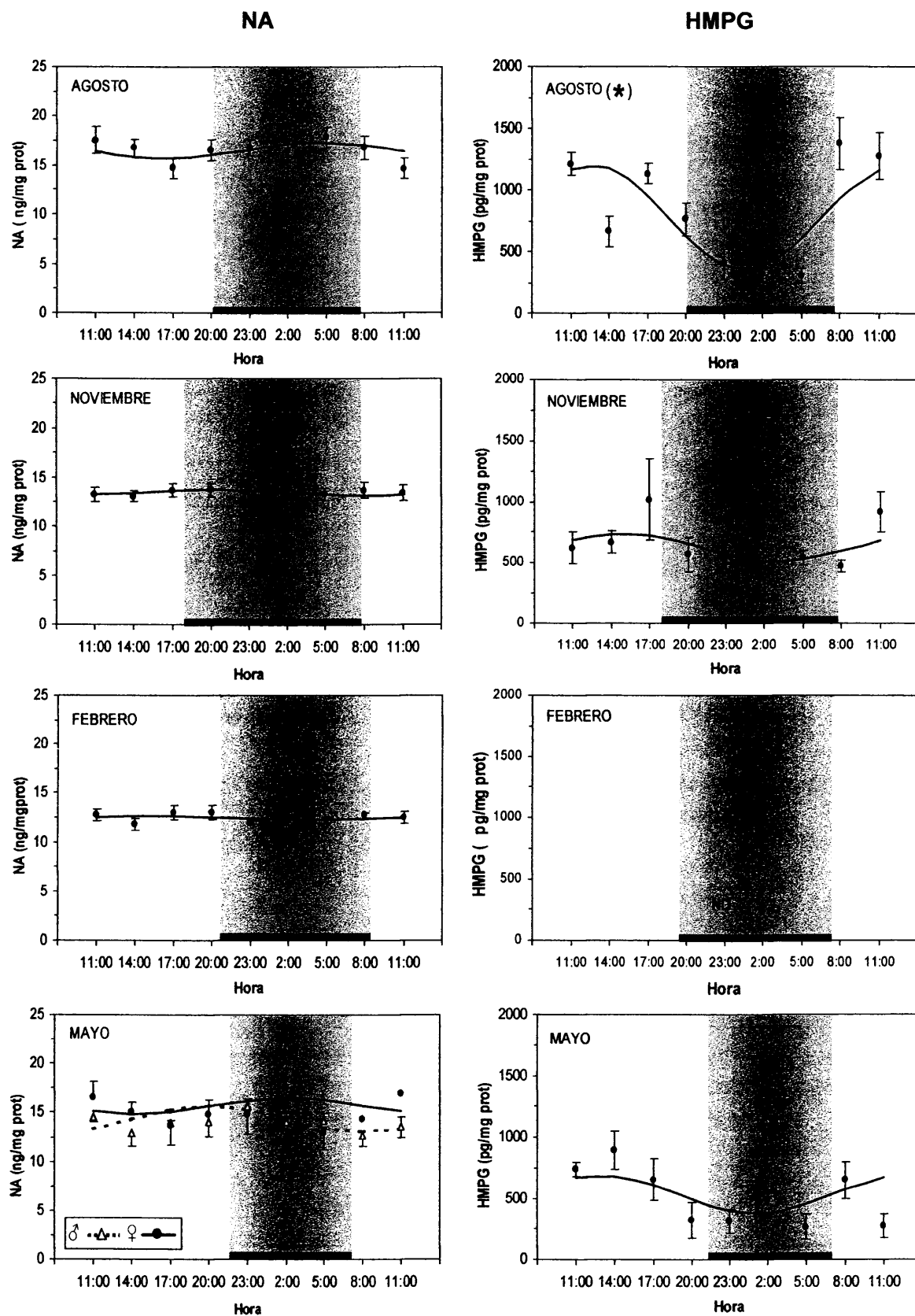
			Ghrelina (pg/ml)	Leptina (ng/ml)	NPY (ng/hipot)	NPY (ng/telenc)
MACHOS	NA (ng/mg prot)	<i>r</i>	0,315	0,310	- 0,443	0,254
		<i>p</i>	< 0,001	0,008	< 0,001	0,004
	DA (ng/mg prot)	<i>r</i>	0,238	0,143	- 0,210	0,244
		<i>p</i>	0,008	0,241	0,021	0,006
	A (pg/mg prot)	<i>r</i>	0,020	0,132	- 0,211	- 0,150
		<i>p</i>	0,823	0,280	0,021	0,098
	5-HT (ng/mg prot)	<i>r</i>	0,186	0,231	- 0,263	0,149
		<i>p</i>	0,034	0,049	0,003	0,088
HEMBRAS	NA (ng/mg prot)	<i>r</i>	0,014	0,014	- 0,304	0,262
		<i>p</i>	0,886	0,908	0,002	0,007
	DA (ng/mg prot)	<i>r</i>	- 0,162	- 0,160	- 0,122	0,181
		<i>p</i>	0,087	0,177	0,218	0,062
	A (pg/mg prot)	<i>r</i>	- 0,009	0,058	0,039	- 0,184
		<i>p</i>	0,924	0,639	0,690	0,061
	5-HT (ng/mg prot)	<i>r</i>	- 0,060	- 0,147	- 0,220	0,178
		<i>p</i>	0,527	0,211	0,025	0,066

NA: Noradrenalina, DA: Dopamina, A: Adrenalina, 5-HT: Serotonina, NPY: Neuropeptido Y. (machos: n = 196, hembras: n = 165). En negrita se muestran las correlaciones estadísticamente significativas.

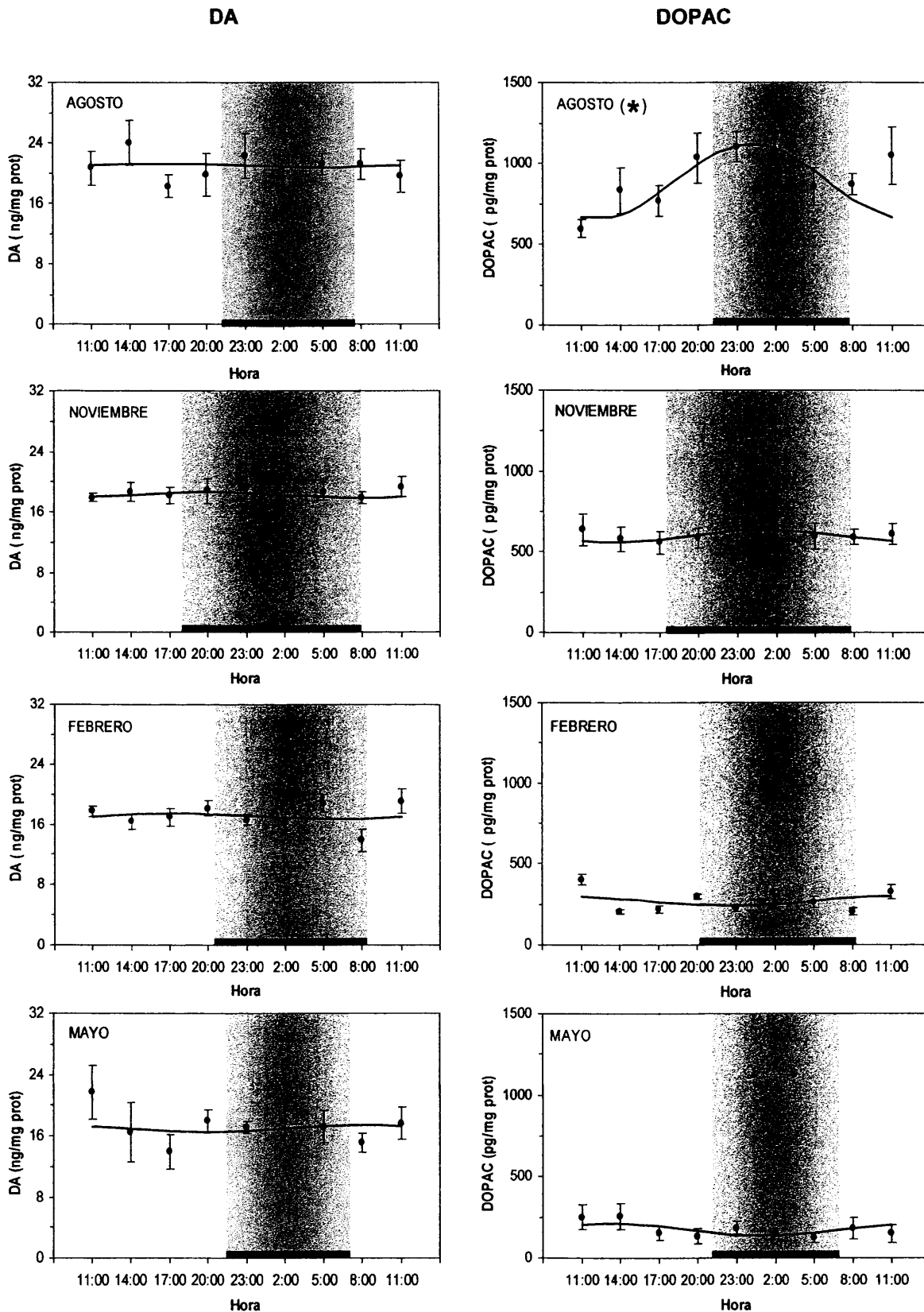
Tabla XIX. Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas de los ritmos diarios del contenido hipotalámico de monoaminas y sus metabolitos a lo largo del año en la tenca (*Tinca tinca*).

	Fecha	$A_0$	$A_1$	$\varphi$	Máx/mín	Ruido/señal
<b>HMPG</b> (ng/mg prot)	19-08-02	<b>777,66 ± 53,67</b>	<b>422,66 ± 76,08</b>	<b>12:37 ± 0,408</b>	<b>3,38</b>	<b>0,18*</b>
	07-11-02	626,46 ± 50,70	113,99 ± 75,22	15:03 ± 1,40	1,44	0,66
	05-02-03	ND	ND	ND	ND	ND
	08-05-03	531,86 ± 52,04	154,88 ± 68,79	12:59 ± 1,14	1,82	0,44
<b>NA</b> (µg/mg prot)	19-08-02	16,50 ± 0,35	0,81 ± 0,52	04:31 ± 1,36	1,10	0,65
	07-11-02	13,39 ± 0,22	0,29 ± 0,31	20:03 ± 2,42	1,04	1,06
	05-02-03	12,44 ± 0,19	0,19 ± 0,29	15:44 ± 3,20	1,03	1,54
	08-05-03 ♂	14,36 ± 0,53	1,34 ± 0,73	20:14 ± 1,23	1,21	0,55
	♀	15,67 ± 0,75	0,83 ± 1,04	02:12 ± 2,94	1,11	1,26
<b>A</b> (ng/mg prot)	19-08-02 ♂	454,62 ± 29,63	26,69 ± 42,62	15:59 ± 3,57	1,12	1,60
	♀	399,86 ± 18,78	63,49 ± 25,04	10:12 ± 0,99	1,38	0,39
	07-11-02	350,11 ± 22,68	2,66 ± 33,47	17:45 ± 27,77	1,02	12,58
	05-02-03	547,62 ± 23,72	43,06 ± 31,38	10:56 ± 1,90	1,17	0,73
	08-05-03	371,27 ± 39,44	29,07 ± 57,75	15:05 ± 4,32	1,17	1,99
<b>DOPAC</b> (ng/mg prot)	19-08-02	<b>886,08 ± 32,26</b>	<b>213,95 ± 44,73</b>	<b>00:08 ± 0,46</b>	<b>1,64</b>	<b>0,21*</b>
	07-11-02	598,53 ± 23,31	38,27 ± 32,41	01:10 ± 2,01	1,14	0,85
	05-02-03	266,86 ± 12,29	29,84 ± 16,30	10:46 ± 3,46	1,25	0,55
	08-05-03	173,98 ± 19,22	39,18 ± 26,48	13:07 ± 1,65	1,58	0,68
<b>DA</b> (µg/mg prot)	19-08-02	21,00 ± 0,75	0,26 ± 1,10	16:37 ± 9,08	1,02	4,28
	07-11-02	18,05 ± 0,41	0,37 ± 0,60	17:24 ± 3,46	1,04	1,65
	05-02-03	17,05 ± 0,41	0,37 ± 0,60	17:24 ± 3,46	1,04	1,65
	08-05-03	16,91 ± 0,94	0,45 ± 1,34	07:53 ± 6,48	1,05	2,96
<b>5-HIAA</b> (µg/mg prot)	19-08-02	3,49 ± 0,14	0,24 ± 0,20	08:27 ± 1,94	1,15	0,83
	07-11-02	1,71 ± 0,06	0,04 ± 0,08	13:22 ± 4,80	1,05	1,98
	05-02-03	1,97 ± 0,11	0,33 ± 0,15	10:48 ± 1,20	1,40	0,45
	08-05-03	1,08 ± 0,13	0,12 ± 0,18	09:55 ± 4,23	1,22	1,72
<b>5-HT</b> (µg/mg prot)	19-08-02	29,91 ± 1,13	0,98 ± 1,66	16:30 ± 3,59	1,07	1,70
	07-11-02	24,26 ± 0,62	1,81 ± 0,89	18:35 ± 1,10	1,16	0,49
	05-02-03	21,53 ± 0,66	0,93 ± 0,15	02:19 ± 2,29	1,09	1,03
	08-05-03	27,28 ± 1,07	2,12 ± 1,46	23:49 ± 1,67	1,17	0,69

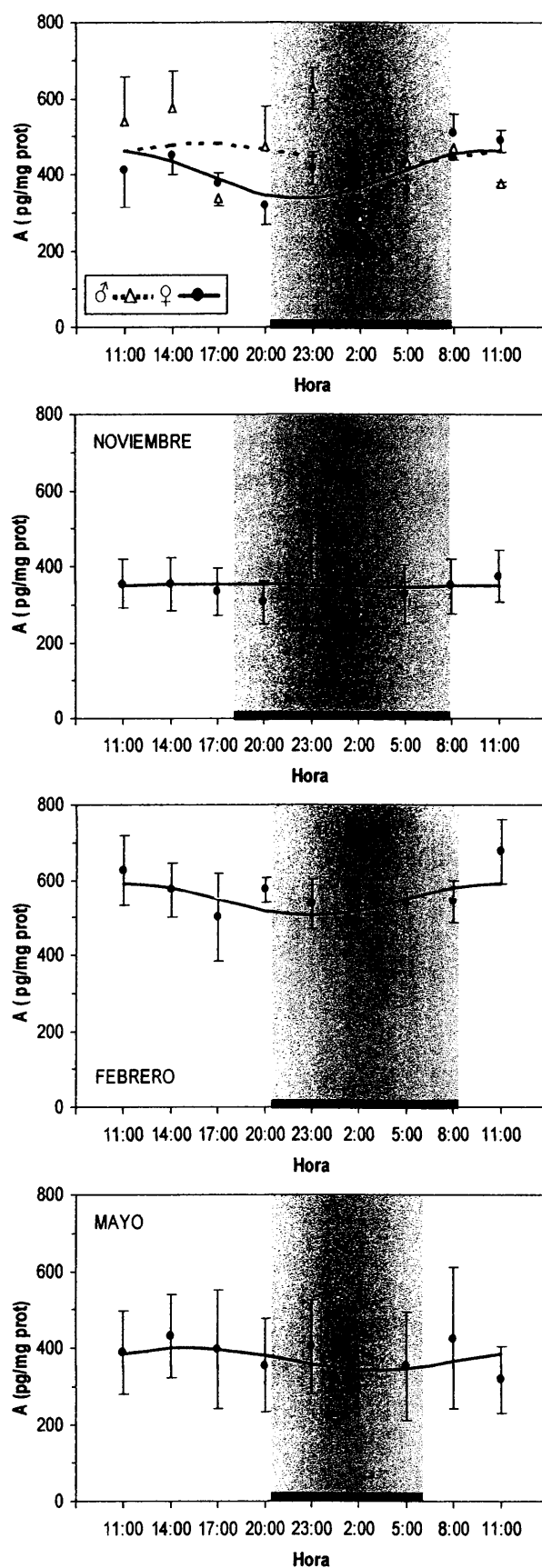
\* El ritmo es significativo (ruido/señal < 0,3), valores en negrita. Los datos se representan como media ± e.e.m.  $A_0$ : Nivel medio o mósor,  $A_1$ : Amplitud sinusoidal,  $\varphi$ : Fase. ND: No detectable.



**Figura 29.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del contenido hipotalámico de NA y HMPG en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 8$ /hora de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.

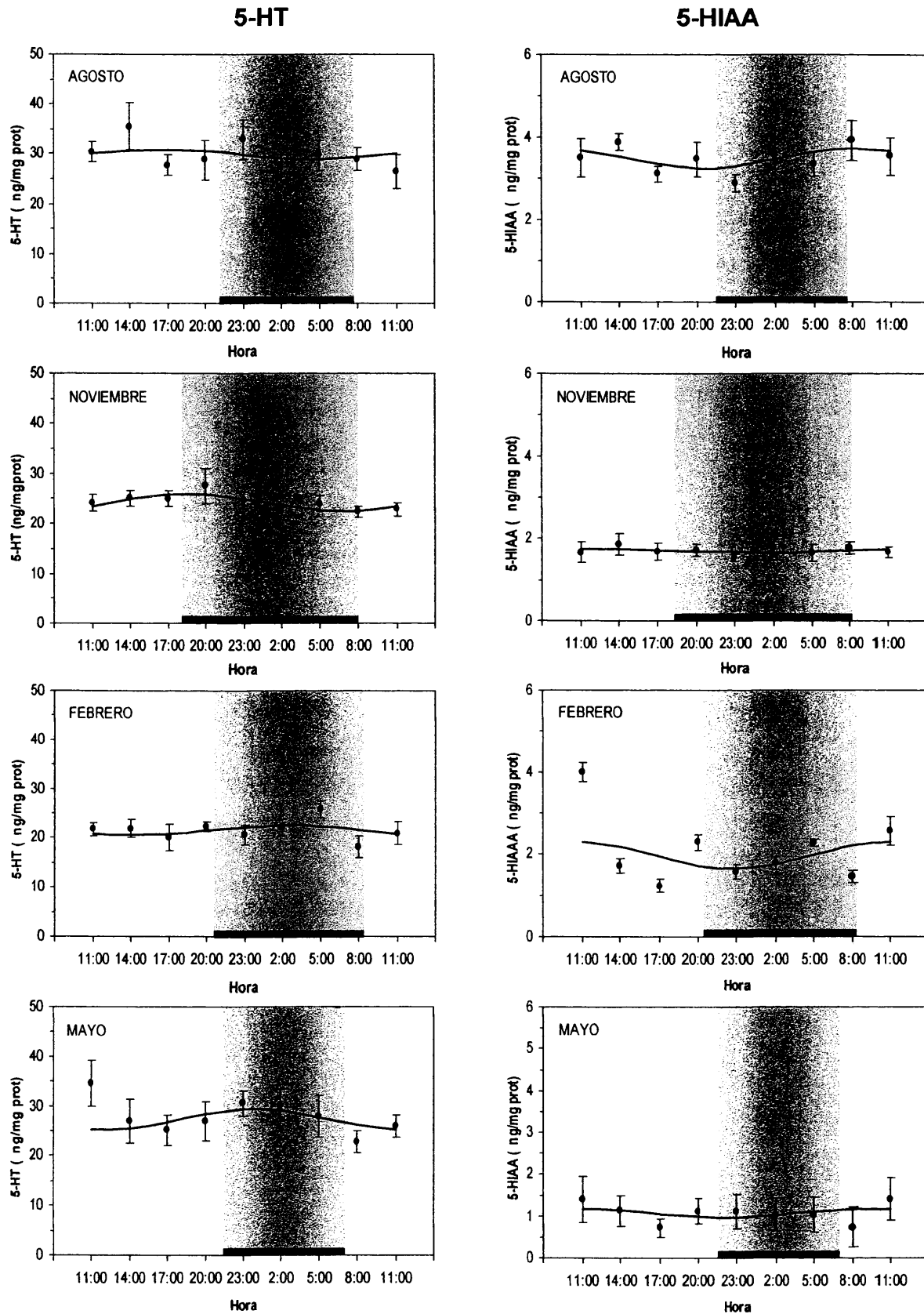


**Figura 30.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del contenido hipotalámico de DA y DOPAC en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n=8$ /hora de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.



**Figura 31.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del contenido hipotalámico de A en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n=8$ /hora de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo.



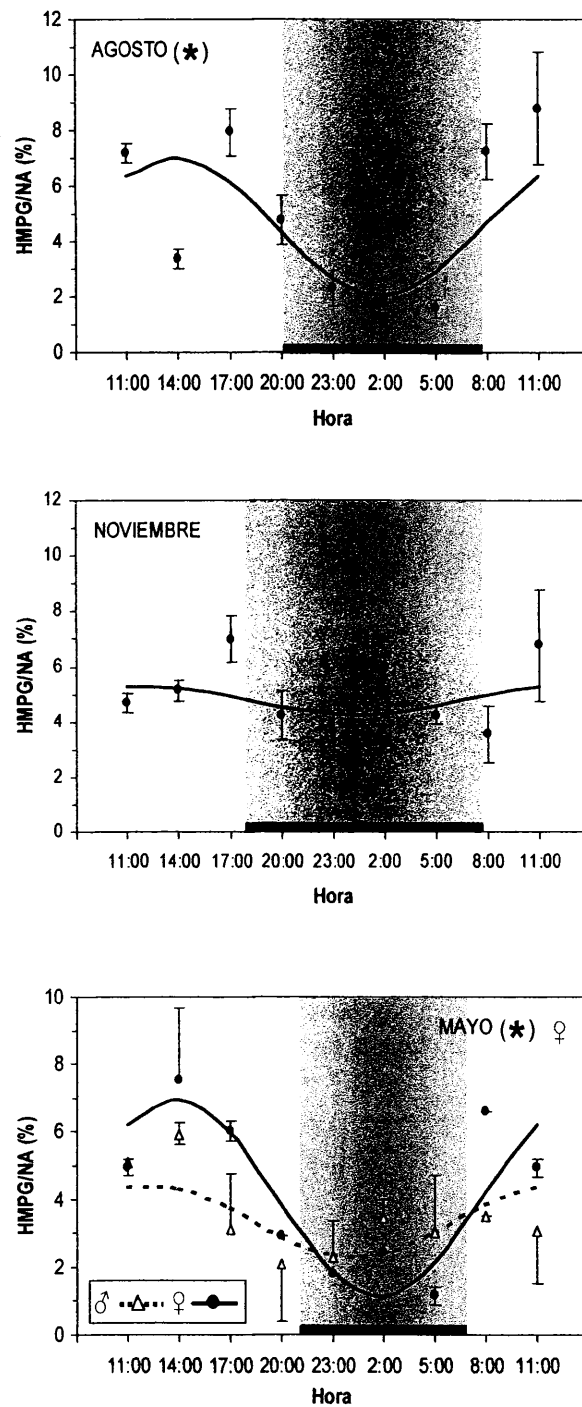


**Figura 32.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del contenido hipotalámico de 5-HT y 5-HIAA en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n=8$ /hora de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo.

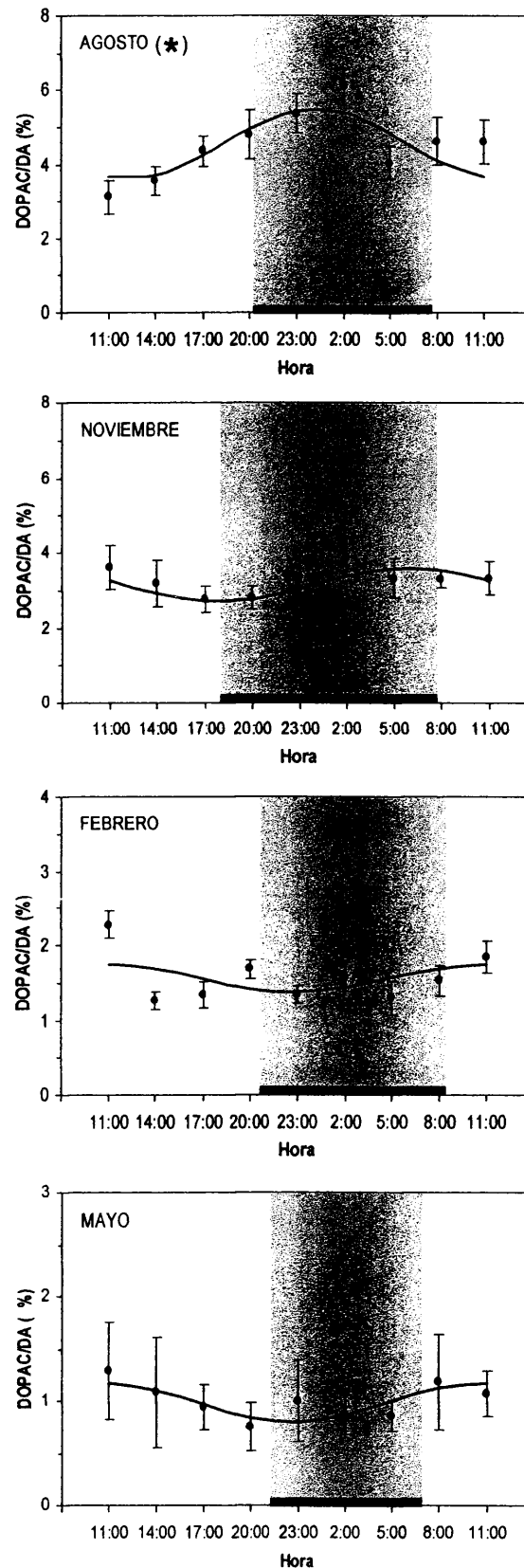
**Tabla XX.** Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas de los ritmos diarios de los cocientes metabolito/monoamina a lo largo del año en la tenca (*Tinca tinca*).

	Fecha	$A_0$	$A_1$	$\varphi$	Máx/mín	Ruido/señal
<b>HMPG/NA (%)</b>	<b>19-08-02</b>	<b>4,51 ± 0,33</b>	<b>2,47 ± 0,47</b>	<b>13:44 ± 0,43</b>	<b>3,41</b>	<b>0,19*</b>
	<b>07-11-02</b>	4,75 ± 0,32	0,54 ± 0,42	12:26 ± 2,04	1,25	0,79
	<b>05-02-03</b>	---	---	---	---	---
	♂	3,36 ± 0,39	1,09 ± 0,50	12:17 ± 1,27	1,97	0,46
	♀	<b>4,03 ± 0,60</b>	<b>2,92 ± 0,79</b>	<b>13:44 ± 0,69</b>	<b>6,26</b>	<b>0,27*</b>
<b>DOPAC/DA (%)</b>	<b>19-08-02</b>	<b>4,55 ± 0,17</b>	<b>0,93 ± 0,23</b>	<b>00:11 ± 0,62</b>	<b>1,52</b>	<b>0,25*</b>
	<b>07-11-02</b>	3,14 ± 0,14	0,44 ± 0,21	06:00 ± 0,99	1,33	0,48
	<b>05-02-03</b>	1,56 ± 0,07	0,19 ± 0,09	10:54 ± 1,23	1,28	0,48
	<b>08-05-03</b>	0,99 ± 0,11	0,19 ± 0,15	10:41 ± 2,05	1,47	0,81
<b>5-HIAA/5-HT (%)</b>	<b>19-08-02</b>	11,85 ± 0,58	1,25 ± 0,77	09:02 ± 1,56	1,24	0,64
	<b>07-11-02</b>	7,14 ± 0,31	0,53 ± 0,46	04:21 ± 1,77	1,16	0,86
	<b>05-02-03</b>	<b>9,52 ± 0,53</b>	<b>2,37 ± 0,70</b>	<b>11:11 ± 0,77</b>	<b>1,66</b>	<b>0,29*</b>
	<b>08-05-03</b>	3,85 ± 0,46	0,33 ± 0,65	08:25 ± 4,48	1,19	1,98

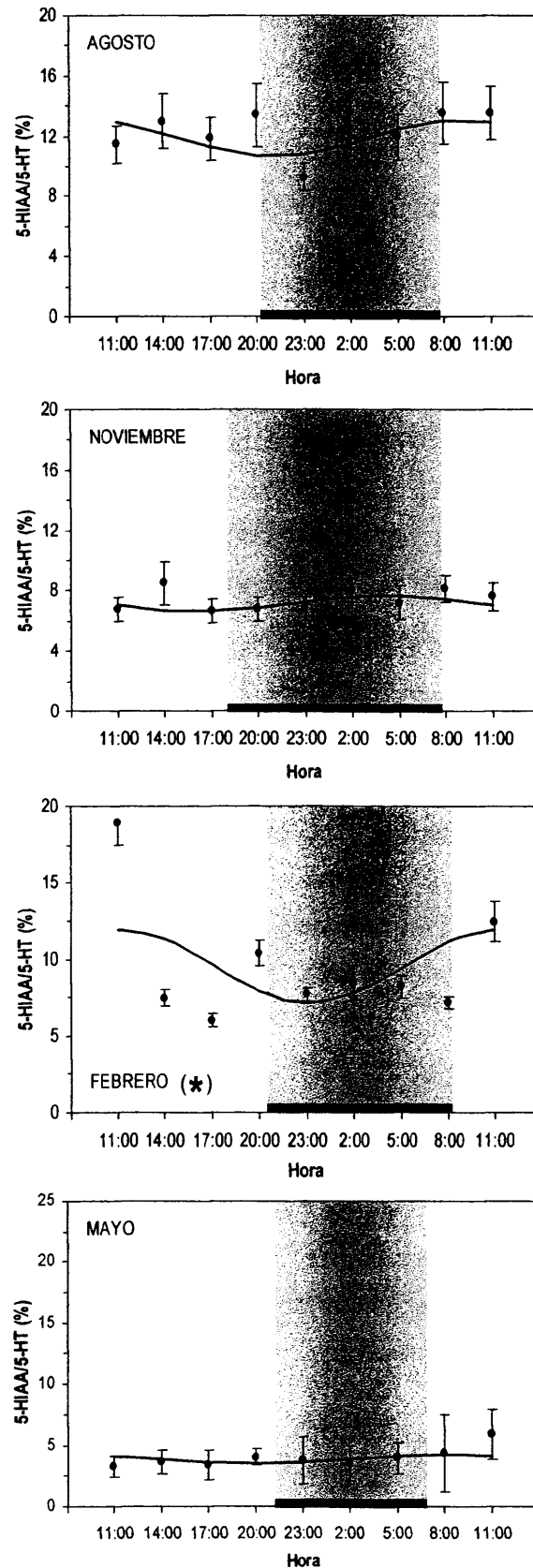
\* El ritmo es significativo (ruido/señal < 0,3), valores en negrita. Los datos se representan como media ± e.e.m.  $A_0$ : Nivel medio o méso,  $A_1$ : Amplitud sinusoidal,  $\varphi$ : Fase.



**Figura 33.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del cociente HMPG/NA en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n=8$ /hora de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.



**Figura 34.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del cociente DOPAC/DA en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 8$ /hora de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.



**Figura 35.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias del cociente 5-HIAA/5-HT en la tenca. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 8$ /hora de muestreo). El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ruido/señal  $< 0,3$ ; ritmo significativo.

estadísticamente significativo únicamente en agosto (ruido/señal = 0,25). La relación 5-HIAA/5-HT (Figura 35) mostró un ritmo diario estadísticamente significativo en invierno (ruido/señal = 0,29).

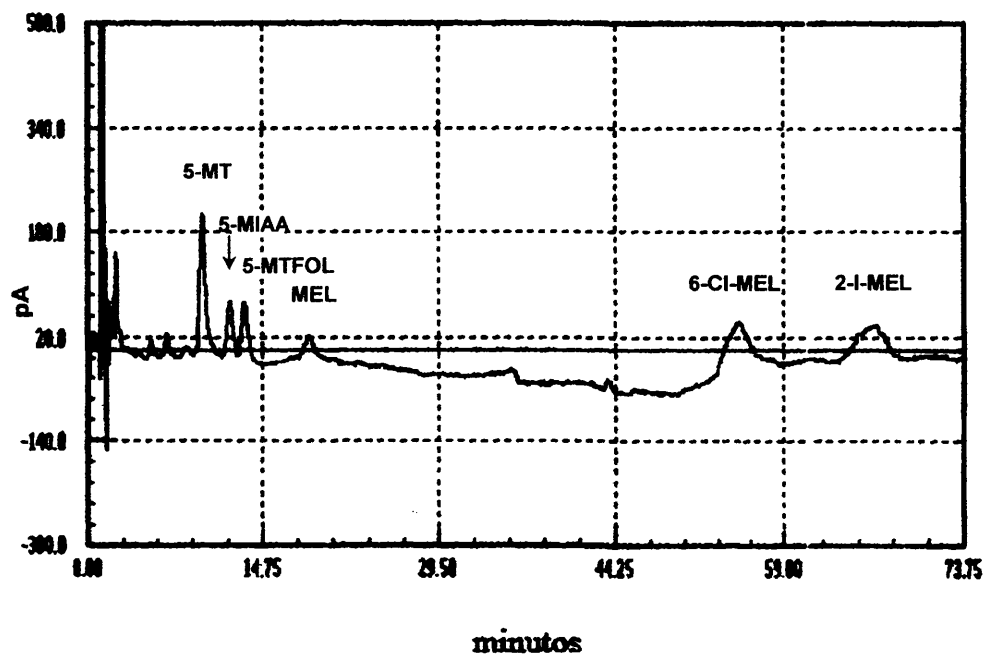
## 5. CONTENIDO DE MELATONINA Y ACTIVIDAD AA-NAT EN EL TEJIDO OCULAR DE *Tinca tinca*.

### 5.1. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES.

En la Figura 36 se muestra un cromatograma tipo de una solución de estándares conteniendo 5-MT, 5-MIAA, 5-MTFOL y MEL a una concentración 10 nM y los estándares internos 6-CI-MEL y 2-I-MEL a una concentración 100 nM. Las condiciones cromatográficas se especifican en el apartado 2.6.2. de Materiales y Métodos. Los tiempos de retención de cada uno de los compuestos se muestran en la Tabla XXI.

La Tabla XXII muestra los parámetros de las funciones sinusoidales definidas por los valores experimentales de actividad AA-NAT y contenido ocular de melatonina. En la Figura 37 se representan los perfiles diarios del contenido de melatonina y de la actividad AA-NAT en la copa óptica y la retina neural de la tenca, respectivamente, en las cuatro estaciones del año. Tanto la actividad AA-NAT como el contenido de melatonina ocular mostraron una ritmicidad diaria significativa con valores elevados durante la escotofase y bajos durante la fase luminosa en primavera y verano. Mientras que en las estaciones frías (otoño e invierno) no hubo ritmo diario (ruido/señal > 0,3), en primavera y verano la actividad de esta enzima mostró un ritmo estadísticamente significativo (ruido/señal < 0,3), siendo más pronunciado en verano (máx/mín > 5). El nivel medio o mésores más elevado se observó en invierno y el más bajo en verano (0,66 y 0,18 nmol/h/mg prot, respectivamente). Las acrofases de los ritmos se producen a mitad de la fase oscura. El valor medio más alto de melatonina ocular se mide en verano (113,50 pg/mg prot), mientras que el más bajo se obtuvo en invierno (28,51 pg/mg prot). La máxima amplitud del ritmo de melatonina ocular se encontró en verano, mientras que la mínima se observó en las estaciones frías.

En la Figura 38 mostramos la relación entre las amplitudes de los ritmos diarios de actividad AA-NAT y melatonina ocular en la tenca con la temperatura media del agua en las distintas estaciones del año. A temperaturas bajas la AA-NAT muestra una actividad reducida y un incremento de tan sólo 3°C en la temperatura media del agua (de 13,5°C a 16,5°C) produce un aumento muy importante en la amplitud del ritmo (67,71%). A temperaturas bajas (invierno, 6,5°C) y medias (otoño, 13,5°C y primavera, 16,5°C) la amplitud del ritmo de melatonina es pequeña, mientras que a temperatura alta (verano,

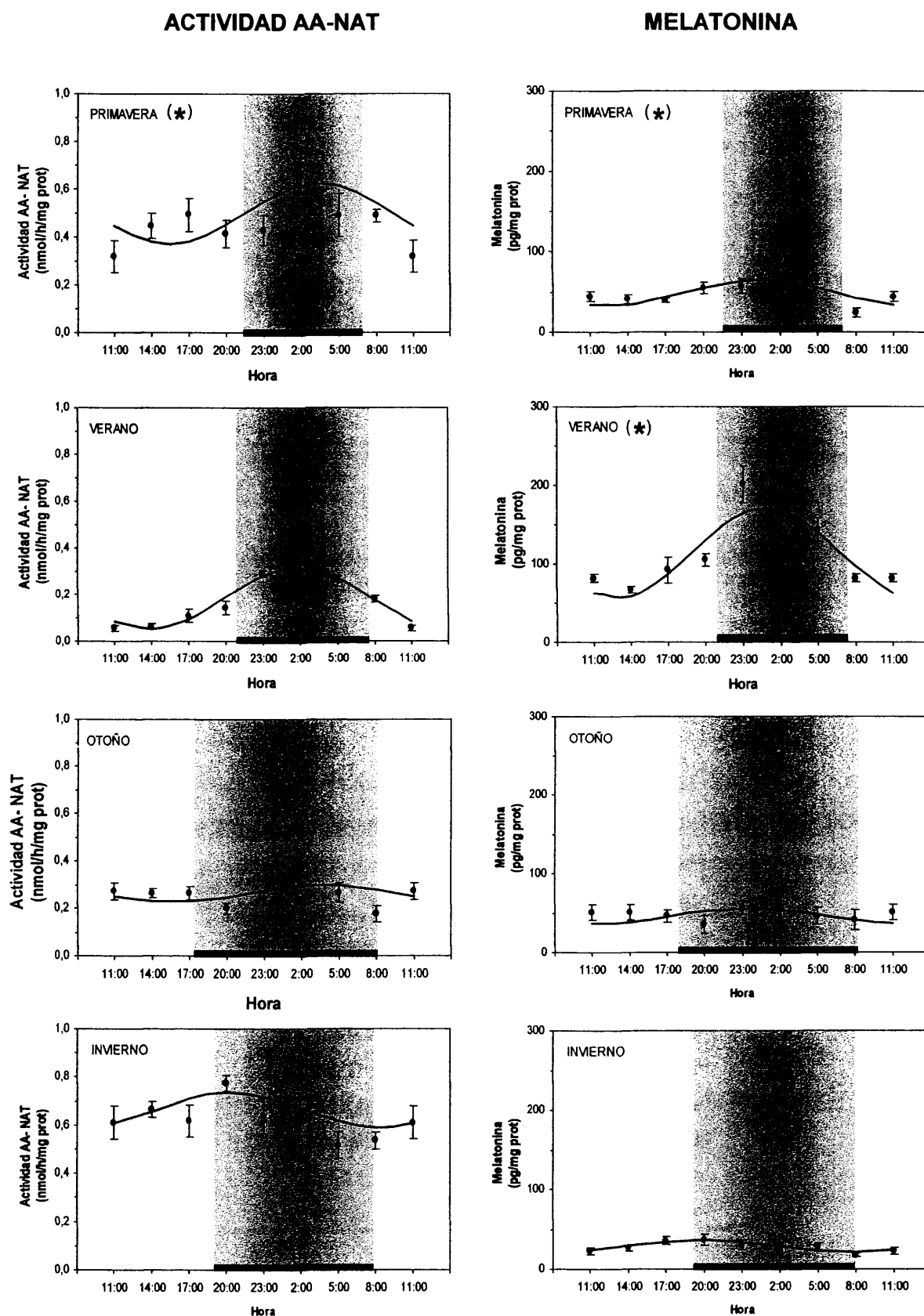


**Figura 36.** Cromatograma tipo de una solución de estándares conteniendo 5-MT, 5-MIAA, 5-MTFOL y MEL a una concentración 10 nM y los estándares internos 6-CL-MEL y 2-I-MEL a una concentración 100 nM.

**Tabla XXI.** Tiempos de retención de los distintos metoxindoles medidos en la copa óptica de *Tinca tinca* y de los compuestos utilizados como estándares internos.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
5-MT	9,69
5-MIAA	12,04
5-MTFOL	13,27
MEL	18,6
6-CL-MEL	55,04
2-I-MEL	66,26

5-MT: 5-metoxitriptamina, 5-MIAA: Ácido-5-metoxindolacético, 5-MTFOL: 5-metoxitriptofol, MEL: Melatonina, 6-CL-MEL: 6-cloro-melatonina, 2-I-MEL: 2-yodo-melatonina.



**Figura 37.** Funciones sinusoidales teóricas que definen las variaciones diarias de la actividad AA-NAT y del contenido en melatonina en la retina neural y la copa óptica de la tenca, respectivamente. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n=8$ /hora de muestreo). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  respecto a la media de los valores diarios. El área sombreada indica la fase oscura del fotociclo. (\*): ritmo significativo; ruido/señal  $< 0,3$ .



24°C) se produce un incremento muy importante de la producción de esta hormona. Este incremento de la amplitud con la temperatura del agua no es lineal ( $p = 0,115$ ). Así, mientras que a temperatura baja, un incremento de 7 °C (desde 6,5 hasta 13,5) provoca un aumento de la amplitud del ritmo del 18,82%, a temperaturas elevadas un aumento de la temperatura de 7 °C (desde 16,5 hasta 24 °C) se traduce en un incremento de la amplitud del ritmo de melatonina del 40,62 %.

En la Figura 39 se comparan los perfiles estacionales de los valores diurnos y nocturnos de actividad AA-NAT y del contenido ocular de melatonina. En verano se produce la síntesis ocular de melatonina más elevada del año, tanto de día como de noche ( $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones), sin embargo, esta elevada producción no se corresponde con una mayor actividad AA-NAT, que muestra los valores menores respecto al resto de las estaciones ( $p < 0,01$ ). Por el contrario, en invierno la actividad enzimática es máxima tanto de día como de noche, pero no va acompañada de una producción significativa de melatonina.

## **5.2. PAPEL DE LA TEMPERATURA EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD AA-NAT Y DEL CONTENIDO DE MELATONINA OCULAR EN LA TENCA.**

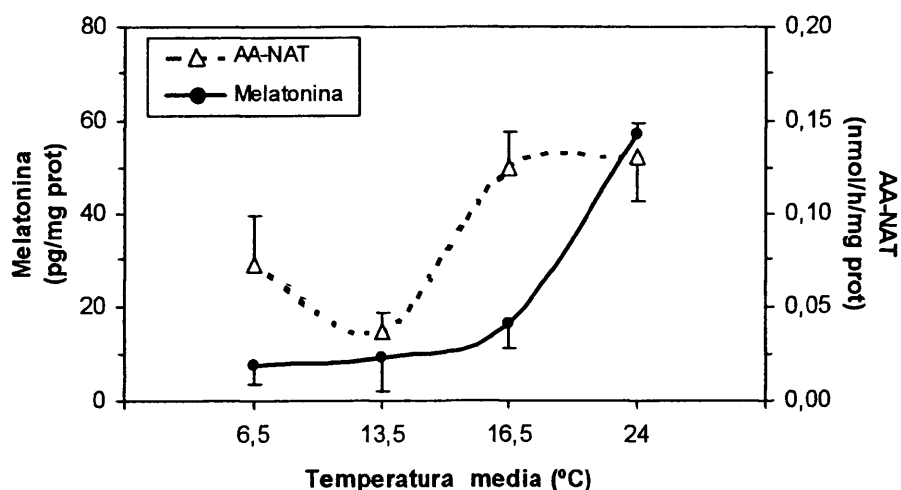
La Figura 40 muestra el efecto de la aclimatación de las tencas a dos temperaturas diferentes sobre la actividad AA-NAT y el contenido de melatonina ocular en la tenca. En tencas aclimatadas a 25°C se observó un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) de la actividad AA-NAT a mitad de la fase oscura del orden de 6 veces respecto a los valores diurnos (Figura 40a). Esta diferencia no se encontró en las tencas aclimatadas a 5°C. Además, la actividad AA-NAT ocular en mitad de la fase luminosa es significativamente mayor ( $p < 0,01$ ) a 5°C que a 25°C. Sin embargo, en mitad de la fase oscura la actividad AA-NAT a 25°C fue significativamente mayor que a 5°C ( $p < 0,01$ ).

Al igual que sucede con la AA-NAT a 25°C, el contenido ocular de melatonina (Figura 40b) fue significativamente mayor en la fase oscura ( $p < 0,01$ ) respecto a la fase luminosa. Esta diferencia día/noche no se observó a baja temperatura, encontrando además, una producción de melatonina muy reducida en las tencas aclimatadas a 5°C, similar a la encontrada en mitad de la fase luminosa en las tencas aclimatadas a 25°C.

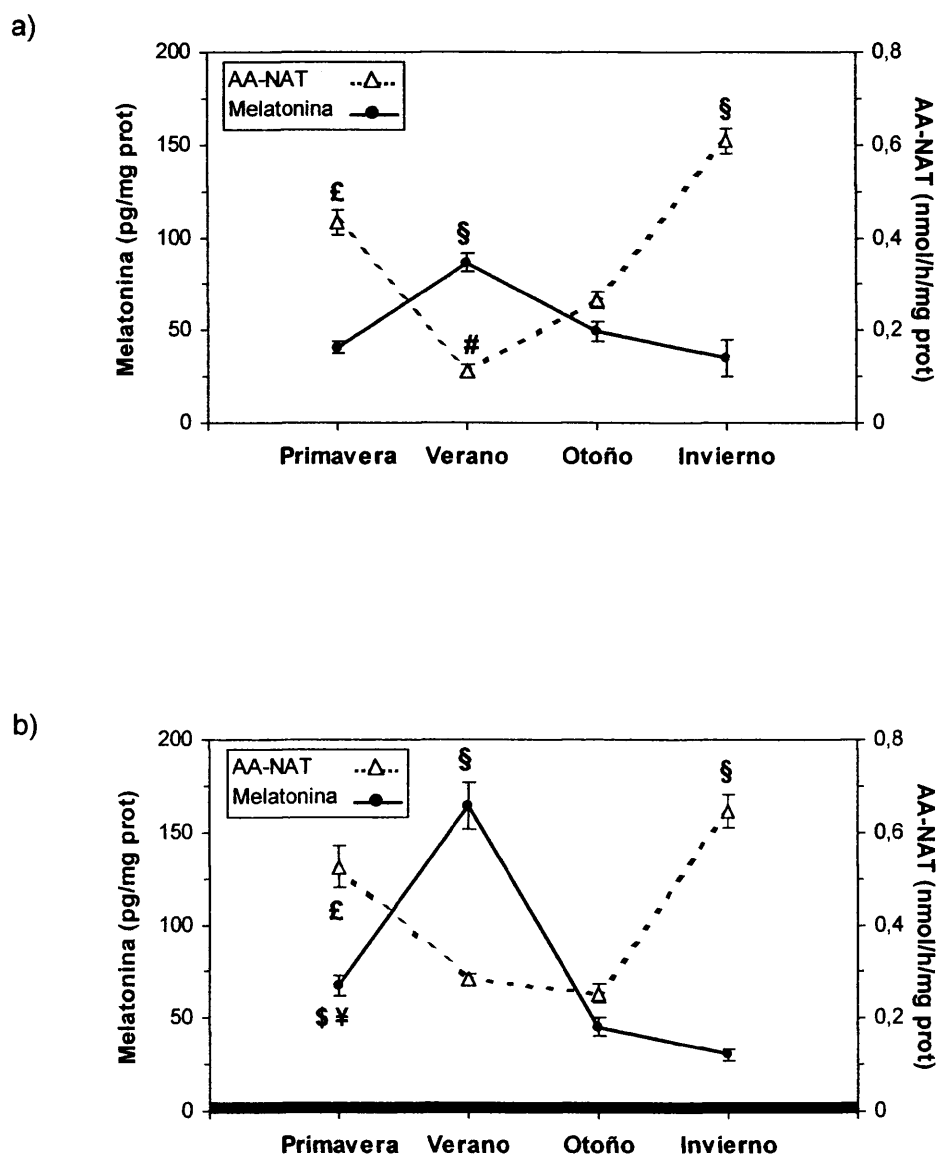
**Tabla XXII.** Parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas de los ritmos diarios de actividad AA-NAT y contenido ocular de melatonina en las cuatro estaciones del año en la tenca (*Tinca tinca*).

	Estación	$A_0$	$A_1$	$\varphi$	Máx/mín	Ruido/señal
<b>AA-NAT</b> (nmol/h/mg prot)	<b>Primavera</b>	<b><math>0,50 \pm 0,018</math></b>	<b><math>0,125 \pm 0,027</math></b>	<b><math>03:29 \pm 0,47</math></b>	<b>1,67</b>	<b>0,21*</b>
	<b>Verano</b>	<b><math>0,18 \pm 0,006</math></b>	<b><math>0,130 \pm 0,009</math></b>	<b><math>01:46 \pm 0,16</math></b>	<b>3,02</b>	<b>0,07*</b>
	<b>Otoño</b>	$0,26 \pm 0,014$	$0,037 \pm 0,019$	$03:53 \pm 1,25$	1,50	0,50
	<b>Invierno</b>	<b><math>0,66 \pm 0,016</math></b>	<b><math>0,072 \pm 0,023</math></b>	<b><math>20:34 \pm 0,72</math></b>	<b>1,25</b>	<b>0,32</b>
<b>Melatonina</b> (pg/mg prot)	<b>Primavera</b>	<b><math>48,90 \pm 2,67</math></b>	<b><math>16,35 \pm 4,05</math></b>	<b><math>00:20 \pm 0,50</math></b>	<b>2,00</b>	<b>0,25*</b>
	<b>Verano</b>	<b><math>113,50 \pm 5,25</math></b>	<b><math>56,97 \pm 7,49</math></b>	<b><math>00:50 \pm 0,30</math></b>	<b>3,02</b>	<b>0,13*</b>
	<b>Otoño</b>	$46,41 \pm 3,71$	$9,30 \pm 5,40$	$23:44 \pm 1,24$	1,50	0,58
	<b>Invierno</b>	<b><math>28,51 \pm 1,69</math></b>	<b><math>7,55 \pm 2,37</math></b>	<b><math>19:37 \pm 0,73</math></b>	<b>1,72</b>	<b>0,31</b>

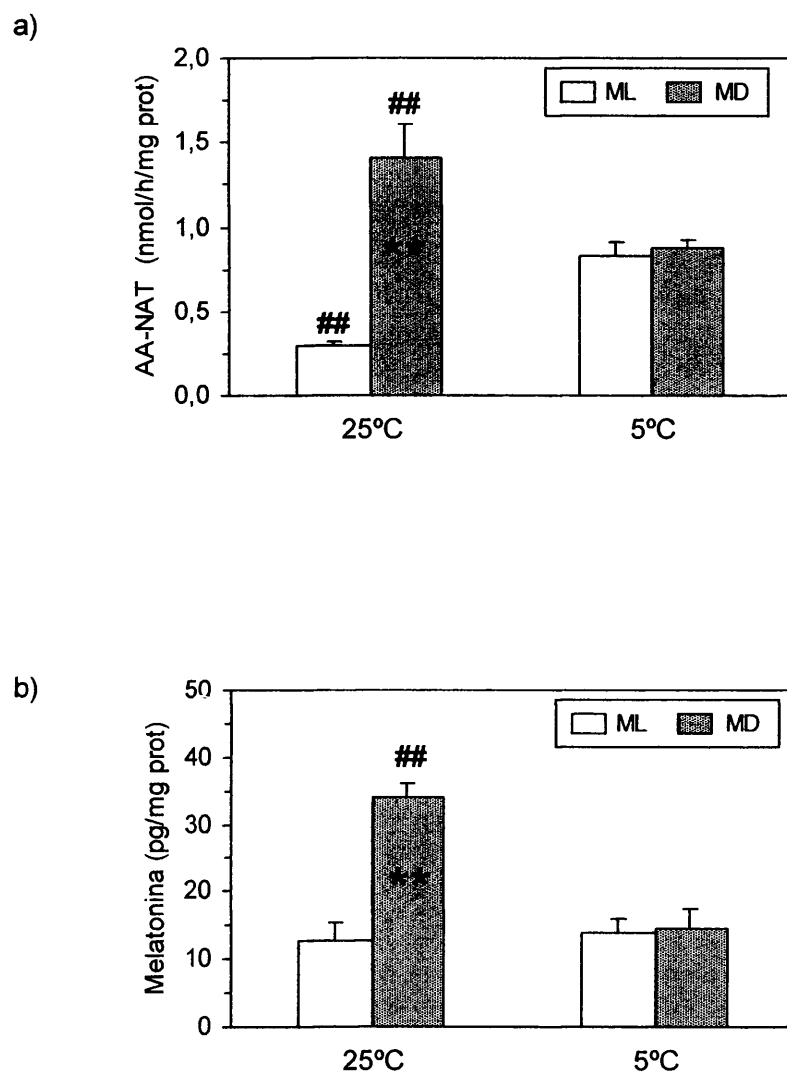
\* El ritmo es significativo (ruido/señal < 0,3), valores en negrita. Los datos se representan como media  $\pm$  e.e.m.  $A_0$ : Nivel medio o mésor,  $A_1$ : Amplitud sinusoidal,  $\varphi$ : Fase.



**Figura 38.** Cambios en la amplitud del ritmo diario del contenido ocular de melatonina y actividad AA-NAT con la temperatura media del agua registrada en las distintas estaciones del año.



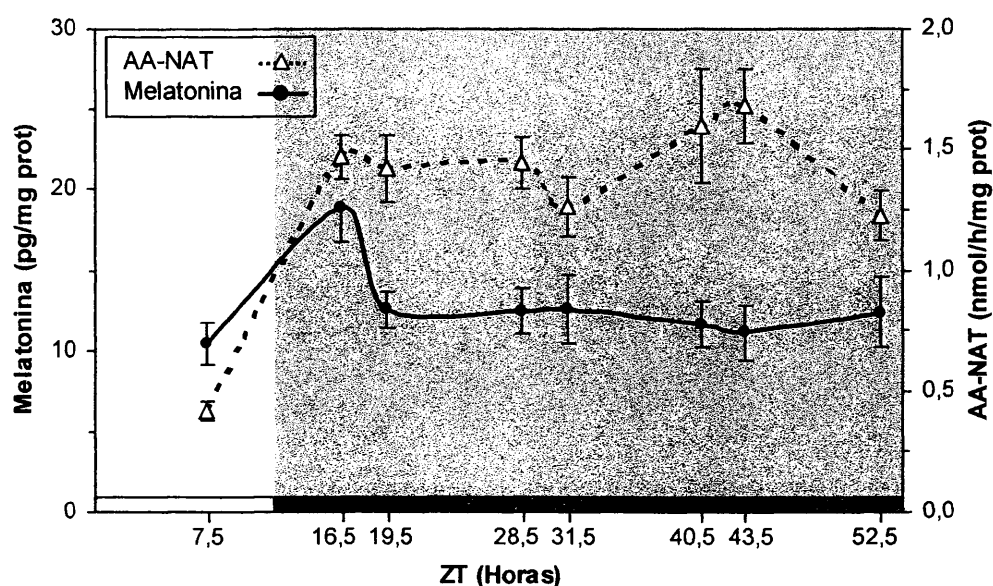
**Figura 39.** Perfil estacional de a) los valores medios diurnos y b) los valores medios nocturnos de actividad AA-NAT y contenido de melatonina en la retina neural y la copa óptica de la tenca, respectivamente. Los datos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales (valores diurnos: primavera y verano  $n = 40$ /estación, otoño  $n = 24$ , invierno  $n = 32$ ; valores nocturnos: primavera y verano  $n = 24$ /estación, otoño  $n = 40$ , invierno  $n = 32$ ). §  $p < 0,01$  respecto al resto de las estaciones; £  $p < 0,01$  respecto a verano y otoño; #  $p < 0,01$  respecto a otoño; \$  $p < 0,01$  respecto a invierno; ¥  $p < 0,05$  respecto a otoño.



**Figura 40.** Efecto de la aclimatación a 12L:12D y 25 y 5°C sobre a) la actividad AA-NAT en la retina neural y b) el contenido de melatonina en la copa óptica de la tenca. Los datos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales ( $n = 8/\text{grupo}$ ). \*\*  $p < 0,01$  respecto a la fase luminosa a la misma temperatura. ##  $p < 0,01$  respecto a 5°C en la misma fase del fotociclo. ML: mitad de la fase luminosa; MD: mitad de la fase oscura.

### 5.3. ESTUDIO DEL POSIBLE CARÁCTER ENDÓGENO DE LA SÍNTESIS RÍTMICA DE MELATONINA Y DE LA ACTIVIDAD AA-NAT EN TEJIDO OCULAR DE LA TENCA.

La Figura 41 representa las variaciones del contenido de melatonina en la copa óptica y de la actividad AA-NAT en la retina neural de la tenca a lo largo de 3 días, estando los dos últimos días sometidas a oscuridad continua. Puede apreciarse como la oscuridad constante a la que se somete a las tencas durante dos días anula el ritmo circadiano, que se observa en condiciones luz/oscuridad, tanto de la melatonina como de la actividad AA-NAT. El contenido de melatonina en la copa óptica de la tenca aumenta la primera noche y disminuye bruscamente hasta niveles basales transcurrida esta primera noche, para mantenerse constante hasta el final del experimento. La actividad AA-NAT muestra un incremento importante (aumenta más de 3 veces respecto a los valores basales) en el primer punto de muestreo de la primera noche (19:30 h, 16,5 ZT). Al contrario de lo que sucede con el contenido ocular de melatonina, en condiciones de curso libre la actividad AA-NAT no cae hasta los niveles basales, sino que se mantiene elevada a lo largo de las 48 h restantes.



**Figura 41.** Actividad AA-NAT en retina neural y contenido de melatonina ocular en tencas sometidas a condiciones de curso libre en oscuridad constante. Los datos representan la media  $\pm$  e.e.m. de los valores experimentales. (n = 7/grupo). Las barras oscuras y grises del eje de abscisas representan la noche y el día subjetivos, respectivamente. ZT: tiempo "zeitgeber".



## **V. DISCUSIÓN**





## 1. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN LA HEMATOLOGÍA.

Los parámetros hematológicos y la bioquímica sanguínea son herramientas válidas muy útiles en la determinación del estado de salud y el equilibrio metabólico en los peces, tanto de vida silvestre como en cultivos intensivos. Sobre estos parámetros influyen un gran número de factores ambientales, tanto naturales (cambios en la temperatura del agua, el oxígeno disuelto, la salinidad, calidad y cantidad de alimento ingerido) como de origen antropogénico. Nuestro estudio se ha dirigido al conocimiento de los posibles cambios diarios y estacionales de estos parámetros de referencia en una población de tencas expuestas a los cambios cíclicos naturales en su ambiente.

### 1.1. SERIE ROJA.

En la presente Memoria se describen en la tenca variaciones significativas del número de eritrocitos y el hematocrito a lo largo del año, con los valores más bajos en otoño e invierno y los más altos en verano. Estas diferencias estacionales pueden deberse a múltiples factores, tanto relacionados con los ciclos fisiológicos naturales del pez (ciclos de crecimiento, alimentación o reproducción), como de origen antropogénico.

Una de las justificaciones más inmediatas al incremento en la serie roja de la tenca durante el verano deriva de la principal función desempeñada por los glóbulos rojos, el transporte de oxígeno. Es bien conocido que los peces que habitan estanques y charcas, y que por tanto están expuestos a grandes variaciones de disponibilidad de oxígeno en el agua, están mejor adaptados y presentan mayor eficacia en la toma de oxígeno a bajas concentraciones de éste que aquellos que habitan en ríos de curso rápido (Love, 1970). Durante el verano se produce una reducción notable de la disponibilidad de oxígeno en el agua como consecuencia de la elevada temperatura, por lo que un incremento del número de glóbulos rojos tiene un notable carácter adaptativo al permitir ajustar las demandas respiratorias a los cambios en la disponibilidad de oxígeno del medio. Además, el incremento en la temperatura del agua no sólo produce una reducción de la solubilidad del oxígeno, sino que aumenta la tasa metabólica y consecuentemente el consumo de oxígeno. Esta hipoxia relativa durante el verano es un fenómeno frecuente en los hábitats naturales de las tencas. En nuestro estudio, el aumento del hematocrito y del número de eritrocitos circulantes registrado en verano puede formar parte de un mecanismo de aclimatación que permitiría a las tencas afrontar, al menos en parte, este aumento en el consumo de oxígeno en esta época del año. De forma similar, en *D. labrax*, cuyas demandas de oxígeno también aumentan en verano (Claireaux y Lagardere, 1999), se ha descrito un incremento en la producción de nuevos eritrocitos en

esta estación (Kavadias y cols., 2004), lo que ayudaría a una transferencia de oxígeno más eficaz, considerando además que en los teleósteos los eritrocitos inmaduros son más eficientes en el transporte de oxígeno que los maduros (Houston y cols., 1996). Incrementos similares en la hemoglobina y en el recuento de glóbulos rojos por efecto de la hipoxia se han descrito en otros teleósteos (Affonso y cols., 2002; Moraes y cols., 2002). El efecto de la temperatura del agua sobre parámetros de la serie roja en los peces se ha investigado en un importante número de especies, habiéndose encontrado una correlación positiva entre temperatura del agua y hematopoyesis en *C. carpio* y *O. mykiss* (Smit y cols., 1981), *G. morhua* e *Hippoglossoides platessoides* (Audet y cols., 1993), *Barilius bendelisis* (Rauthan y Grover, 1994) y *Limanda ferruginea* (Mercaldo-Allen y cols., 2003). De forma paralela durante el invierno hay una disminución del hematocrito y la hemoglobina en *C. carpio* (Svetina y cols., 2002) y en *G. morhua* (Magill y Sayer, 2004), y en el número de eritrocitos circulantes en el ciprínido *Phreatichthys andruzzii* (Frangioni y cols., 1997). Nuestros resultados del muestreo de invierno, con menor recuento de glóbulos rojos y menor hematocrito en otoño e invierno, corroboran también para la tenca este efecto de la temperatura sobre los glóbulos rojos.

El aumento de glóbulos rojos circulantes durante el verano parece tener su origen en el bazo, que es el órgano principal que almacena y libera eritrocitos en función de las demandas respiratorias de los peces (Press y Evensen, 1999). Así, en los peces, al igual que sucede en otros vertebrados, situaciones que también requieren un incremento en la capacidad de transporte de oxígeno, como durante un ejercicio intenso, cursan con un incremento agudo del hematocrito debido a la liberación de glóbulos rojos almacenados en el bazo (Pearson y Stevens, 1991; Gallagher y Farrell, 1998). No obstante, el aumento de hematocrito no necesariamente ha de ir asociado a un aumento del número de glóbulos rojos circulantes, sino que puede ser resultado de una extravasación del plasma hacia los tejidos o incluso de un incremento en el tamaño de los eritrocitos. En el caso de las tencas el aumento en el hematocrito no parece deberse a un aumento en el volumen celular, ya que en verano, dicho incremento no se acompaña de un aumento en el VCM, y si de un mayor recuento celular.

Por otra parte, el ayuno produce una reducción en las diferentes poblaciones de células sanguíneas, habiéndose encontrado una disminución del número de glóbulos rojos acompañada de la correspondiente reducción en el valor hematocrito y en la concentración de hemoglobina en varias especies de peces (Mahajan y Dheer, 1983; Vosyliene y Kazlauskienė, 1999; Rios y cols., 2002; Řehulka y Adamec, 2004; Řehulka y cols., 2004), si bien, la duración del periodo de ayuno necesario para inducir anemia

depende de la especie, del estado fisiológico y nutricional y de las condiciones ambientales (Lim y Klesius, 2003). Este efecto depresor del ayuno sobre la hematopoyesis concuerda con los valores bajos encontrados en los parámetros hematológicos en la tenca durante el invierno, estación durante la cual esta especie prácticamente no se alimenta (Guijarro y cols., 1999). En base a estos resultados generalizables a la mayoría de los peces, se considera que el hematocrito es un buen índice del estado nutricional y de salud, siendo la anemia un efecto común de una malnutrición crónica (Cypher y Frost, 1999; Potti y cols., 1999; Piersma y cols., 2000).

En la tenca, no hemos encontrado una correlación estacional entre hematocrito y estado nutricional general, si bien en las hembras el hematocrito es significativamente menor que en los machos tanto en primavera como en otoño. Además, el hematocrito disminuye notablemente en otoño, después de la freza, época en la que se produce un agotamiento importante de las reservas energéticas. Pedrera y colaboradores (1992) encontraron en la tenca una disminución importante en el número de eritrocitos en el periodo previo a la freza, este cambio está asociado a la reproducción y se revierte inmediatamente después de la freza. Esta relación entre el momento del ciclo reproductor y distintos parámetros hematológicos también se ha puesto de manifiesto en otras especies como *D. labrax* (Kavadias y cols., 2004), *S. trutta*, *Thymallus thymallus* (tímalo) y *Chondrostoma nasus* (condrostoma común) (Luskova, 1997) en las que el número de eritrocitos circulantes, el hematocrito y la concentración de hemoglobina están elevados durante la madurez sexual y el desove. En este mismo sentido, nuestros datos en la tenca en relación con el dimorfismo sexual en el hematocrito en verano y otoño (valores inferiores en las hembras que en los machos) corroboran esta relación entre ciclo reproductor y hematocrito. Un dimorfismo sexual similar se ha observado en numerosas especies de peces, como *Micropterus salmoides* (Steuke y Atherton, 1965), *E. lucius* (Mulcahy, 1970), *Salvelinus fontinalis* (McCormick y Naiman, 1985), *Alosa sapidissima* (Leonard y McCormick, 1999) y *O. mykiss* (Sano, 1960; Řehulka y cols., 2004), teniendo en todos los casos valores superiores de hematocrito en los machos respecto de las hembras.

En la tenca los glóbulos rojos y el hematocrito muestran una buena correlación estacional, pero no siempre se obtienen buenas correlaciones entre ambos parámetros. Este hecho puede deberse a que, mientras que el recuento de glóbulos rojos es un índice directo, los cambios en el valor del hematocrito pueden estar causados tanto por alteraciones del volumen de sangre total (que a su vez está en función del volumen total de plasma) como del propio volumen de eritrocitos, que a su vez depende de la

eritropoyesis y del tamaño celular. Es decir, el hematocrito puede variar con el estado de hidratación del animal (que determina el volumen de plasma), y también con el balance iónico y osmótico, que puede afectar tanto al volumen de plasma como al tamaño celular (Morton, 1994). Una forma de detectar esta posible hiposmosis del pez es mediante los cambios en otros índices hematimétricos, como el VCM.

Las concentraciones de hemoglobina encontradas en la tenca en este estudio son ligeramente mayores que las descritas para otras especies de peces (Blaxhall y Daisley, 1973; Lim y Klesius, 2003), aunque son muy similares a las halladas en el sábalo americano (Leonard y McCormick, 1999), en la cachama (*Colossoma macropomum*, Affonso y cols., 2002) y en la lubina (Kavadias y cols., 2004). Estas diferencias en los valores de referencia pueden deberse a los múltiples factores de los que depende la concentración de hemoglobina, tanto endógenos, como la edad, el estado nutricional general del pez y su estilo de vida; como antropogénicos, tales como la manipulación, el transporte, la densidad de individuos, las condiciones en que se realiza la toma de muestras o los diferentes métodos usados en la determinación del contenido de hemoglobina. El tamaño del pez es otro de los factores que pueden influir tanto sobre la concentración de hemoglobina como en el número de eritrocitos circulantes, como se ha observado en la trucha arcoiris (Lowe-Jinde y Niimi, 1983; Martínez y cols., 1994). De hecho, en tencas macho el peso corporal está relacionado con la concentración de hemoglobina y con los índices corpusculares derivados de ésta.

En la tenca, el incremento en el número de glóbulos rojos y el hematocrito observado en verano no va acompañado de un incremento en la HCM, probablemente debido al menor contenido de hemoglobina en los eritrocitos inmaduros, de forma similar a lo que sucede en *D. labrax*, especie en la que tampoco se produce un paralelismo entre el incremento del hematocrito en agosto y el contenido de hemoglobina de los glóbulos rojos (Kavadias y cols., 2004). Como en el caso de *D. labrax*, los eritrocitos en la tenca podrían madurar más tarde, por lo que el descenso en el número de glóbulos rojos en otoño respecto a verano no va acompañado de una disminución en la HCM y la CCMH.

En el presente estudio hemos encontrado variaciones estacionales en el VCM, con los valores más elevados en otoño y los más bajos en verano e invierno. La disminución en verano podría deberse a un menor tamaño de los glóbulos rojos inmaduros respecto a los maduros, mientras que el menor VCM en invierno podría estar más bien relacionado con las bajas temperaturas del agua. De hecho, en otras especies de teleósteos también se han descrito fluctuaciones anuales en el VCM debidas a variaciones en factores ambientales. Por ejemplo, en *T. thymallus*, *S. trutta* y *C. nasus* este índice corpuscular se

correlaciona positivamente con la temperatura del agua (Luskova, 1997), mientras que en la lubina rayada (*Morone saxatilis*) se ha demostrado la existencia de una correlación positiva entre la longitud del día y el VCM (Lochmiller y cols., 1989). En otras especies como *D. labrax*, por el contrario, el VCM no muestra importantes fluctuaciones a lo largo del año y no se modifica ni por oscilaciones estacionales de distintos parámetros abióticos (temperatura del agua, oxígeno disuelto y longitud del día), ni por el consumo de alimento o la madurez sexual (Kavadias y cols., 2004).

Respecto a las variaciones diarias, en la tenca el número de glóbulos rojos, el hematocrito y la hemoglobina exhiben un ritmo diario significativo en primavera y verano, con la acrofase hacia el final de la fase oscura en todos los casos. En la bibliografía consultada no hemos encontrado ningún estudio previo que investigue esta ritmicidad diaria en la hematología de los peces. Nuestros resultados podrían estar relacionados con el patrón estricto de actividad nocturna de la tenca (Herrero y cols., 2003; Vera y cols., 2004a) dado que los cambios en el hematocrito se correlacionan con modificaciones en el patrón general de actividad de los peces. Como hemos comentado previamente, se ha descrito un incremento en la liberación de eritrocitos desde el bazo, que se traduce en un mayor valor hematocrito, tras el aumento de la actividad en distintas especies de peces (Pearson y Stevens, 1991; Franklin, 1993; Lowe y Wells, 1997; Press y Evensen, 1999). La ausencia de ritmo diario en el número de glóbulos rojos y el hematocrito durante las estaciones frías, principalmente en invierno, puede ser una consecuencia de la disminución de la actividad nocturna de la tenca durante estas estaciones frías, probablemente como respuesta al descenso de la temperatura. Sin embargo, esta hipótesis no explica la ritmicidad diaria observada en la concentración de hemoglobina en la tenca en invierno. Por el momento no conocemos el significado fisiológico de estos resultados, y consideramos necesario implicar, a otros factores, como el ayuno que experimentan las tencas a bajas temperaturas (Guijarro y cols., 1999), ya que se ha demostrado su papel relevante en la reducción del número de glóbulos rojos, el hematocrito y la concentración de hemoglobina en peces (Lim y Klessius, 2003).

## 1. 2. SERIE BLANCA.

En la tenca el número total de glóbulos blancos circulantes muestra marcadas variaciones estacionales, con cifras muy superiores en verano respecto a las restantes estaciones, y valores mínimos en invierno. Con lo que nuestros resultados corroboran también para la tenca la marcada estacionalidad del sistema inmune demostrada anteriormente para otras especies de peces (Zapata y cols., 1992), y evaluada en relación con la función fagocítica (Collazos y cols., 1995b), la proliferación de linfocitos

inducida por mitógenos (Collazos y cols., 1996) o la morfometría de órganos linfoides como el bazo o el pronefros (Álvarez y cols., 1998). Estudios previos han realizado recuentos totales y diferenciales de glóbulos blancos circulantes en ciertas estaciones (Pedrera y cols., 1992; Collazos y cols., 1998), siendo las cifras de una magnitud similar a las presentadas por nosotros.

Entre los numerosos factores que pueden estar influyendo en el número de leucocitos circulantes, uno de los más citados es la calidad del agua. Así, en la tenca coincide el mayor número de glóbulos blancos circulantes con el verano, época en que la calidad del agua disminuye notablemente, y cuando de hecho mueren más tencas tanto en sus hábitats naturales como en condiciones de cultivo intensivo. Nuestros valores de glóbulos blancos seis veces más altos en verano que en invierno corroboran la hipótesis de una inmunoestimulación asociada al verano, sugerida previamente para esta especie (Collazos y cols., 1995a,b,c). Dos de los factores abióticos que experimentan una marcada estacionalidad, que condiciona la calidad del agua, y pueden estar regulando estos cambios estacionales del sistema inmune son la temperatura y el fotoperiodo. Un efecto positivo del incremento de la temperatura sobre el número total de leucocitos circulantes ha sido descrito previamente en numerosas especies de peces (*O. mykiss*, Houston y cols., 1996; *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, Hrubec y cols., 1997; *T. thymallus*, *S. trutta* y *C. nasus*, Luskova, 1997; *D. labrax*, Kavadias y cols., 2004), habiéndose documentado ampliamente una acción reguladora clave de este factor ambiental sobre la respuesta inmune en la tenca (Collazos y cols., 1994c; 1995a,c). La disminución drástica del número total de leucocitos circulantes en el invierno en la tenca puede estar relacionada con las bajas temperaturas, habiéndose demostrado el potente efecto de este factor ambiental sobre la respuesta inmune, tanto específica como inespecífica, en esta especie (Collazos y cols., 1994a,c, 1995c) y en otros teleósteos (Alcorn y cols., 2002). No obstante, no podemos ignorar que otros factores ambientales también pueden estar determinando la disminución del número de glóbulos blancos en los meses fríos, como por ejemplo el ayuno. Estudios realizados por Mahajan y Dheer (1983) y posteriormente por Lim y Klesius (2003) han puesto de manifiesto una disminución del número de leucocitos como consecuencia del ayuno. Además, la ausencia de alimentación provoca la desaparición de leucocitos inmaduros, lo que podría explicar el descenso en el número de leucocitos maduros registrado tras un periodo de ayuno y podría poner de manifiesto la incapacidad de los peces para producir nuevas células sanguíneas en estas condiciones. El hecho de que la tenca en invierno no se alimente de forma natural (Guijarro y cols., 1999) apoya este papel regulador del ayuno sobre el sistema inmune.

Teniendo en cuenta que los leucocitos constituyen la primera línea de defensa inespecífica en los peces, el perfil anual similar en ambos sexos seguido por el recuento total de leucocitos es esperable, y coincide con resultados previos en esta misma especie (Svoboda y cols., 2001). Sin embargo, hemos observado cambios anuales significativos en el porcentaje de linfocitos y monocitos en las hembras, y de trombocitos y monocitos en los machos. En otras especies también se han encontrado diferencias entre sexos en las variaciones anuales de los distintos tipos de leucocitos. Así, en *S. maxillosus*, los machos no muestran variaciones en el recuento diferencial a lo largo del ciclo reproductor, mientras que en las hembras se observan cambios estacionales en el porcentaje de linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos (Ranzani-Paiva y cols., 2003). Por lo tanto, a partir de estos datos se puede sugerir que algunas de estas variaciones anuales en determinados subtipos celulares pueden estar relacionadas con el ciclo reproductor. En las tencas hembras hemos observado un incremento en el porcentaje de linfocitos después de la freza (en verano), de acuerdo con los datos de hembras maduras de *S. maxillosus*, que presentan un aumento en el porcentaje de este tipo celular (Ranzani-Paiva y cols., 2003). Sin embargo, en *S. trutta* se observa una reducción en el porcentaje de linfocitos en ambos sexos durante la madurez sexual (Pickering, 1986), que es justificada por este autor mediante la correlación del descenso del porcentaje de linfocitos con el incremento de la actividad interrenal y, por tanto, de los niveles plasmáticos de cortisol, como consecuencia del estrés causado por la freza.

A pesar de la abundante información existente sobre la función inmune en los peces, no existe información previa relativa a las posibles variaciones diarias. En la tenca el número de glóbulos blancos varía de forma significativa a lo largo del día en primavera e invierno siguiendo ritmos con distintas acrofases en ambas estaciones. En la sincronización de los ritmos diarios de diferentes parámetros fisiológicos intervienen, principalmente el fotoperiodo, la temperatura y la alimentación (Refinetti, 2000), habiéndose descrito la influencia notable que ejercen estos factores sobre el número total de leucocitos circulantes (Langston y cols., 2002; Melingen y cols., 2002; Leonardi y Klempau, 2003; Lim y Klessius, 2003). Puesto que estos “zeitgebers” experimentan marcadas variaciones a lo largo del año, cabe esperar que la respuesta del sistema circadiano de los peces a estas señales exógenas pueda variar dependiendo de la estación, lo que justificaría los distintos perfiles del ritmo diario de leucocitos en distintas estaciones. Hay otros factores que también pueden estar implicados. Por ejemplo, el estrés, en general, y concretamente el estrés físico causado por la manipulación, afecta al sistema inmune de los peces (Yada y Nakanishi, 2002), habiéndose observado que la respuesta de los glóbulos blancos al estrés por manipulación varía con las estaciones

(Hofer y cols., 2000). Además, el comportamiento de cortejo y el desove que se producen durante la primavera implican en cierto modo una situación de estrés, que podría estar afectando también al perfil del ritmo diario.

Cuando analizamos las variaciones diarias en las distintas poblaciones de leucocitos encontramos diferentes perfiles dependiendo de la estación y del tipo de leucocito, siendo los monocitos, los que a pesar de su reducida presencia, exhiben ritmos diarios significativos en otoño e invierno. En este sentido se ha sugerido que las distintas poblaciones de glóbulos blancos en la trucha arcoiris muestran una sensibilidad diferente al estrés y a factores ambientales, como el fotoperiodo (Leonardi y Klempau, 2003). En la tenca, los granulocitos y los monocitos, principales poblaciones celulares responsables de la función fagocítica y con una vida media más corta que el resto de leucocitos, son los que muestran ritmos día/noche significativos, principalmente en otoño e invierno, con valores muy inferiores durante la fase oscura del fotociclo diario. Con los datos disponibles, aunque puede resultar especulativo, es atractivo plantear una posible relación entre ritmicidad de melatonina y ritmicidad del sistema inmune. Por un lado existen datos que apoyan un papel modulador de la melatonina sobre distintas etapas del proceso fagocítico en homeotermos (Rodríguez y cols., 1998, 2001; Barriga y cols., 2001), por otro la estacionalidad del ritmo de MEL en la tenca (con ritmos robustos durante el verano) puede contribuir a explicar, al menos en parte, la estacionalidad del sistema inmune en esta especie, con una marcada inmunoestimulación a temperaturas altas (Collazos y cols., 1995a).

## **2. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN LA BIOQUÍMICA PLASMÁTICA Y LAS RESERVAS METABÓLICAS EN *Tinca tinca*.**

En las regiones templadas los peces están sujetos a ciclos estacionales durante los cuales periodos de alimentación y crecimiento, a temperaturas relativamente elevadas, se alternan con periodos de ayuno a bajas temperaturas, dinámica estacional que impone un uso controlado de sus reservas energéticas. Estos ciclos de alimentación/ayuno y las variaciones tanto cuantitativas, como cualitativas de la dieta a lo largo del año se traducen en variaciones en los constituyentes corporales de los peces. Así, los índices de condición, las reservas energéticas, las capacidades metabólicas y la composición química de los tejidos fluctúan estacionalmente reflejando, principalmente, cambios en la actividad alimentaria, la disponibilidad de nutrientes o la maduración sexual (Martínez y cols., 1999).



Las estrategias utilizadas por los peces para sobrevivir a los periodos de ayuno son muy variadas y dependen de la historia evolutiva del grupo al que pertenecen. Así, algunas especies, como *C. auratus*, *O. mykiss* o *G. morhua* preservan las reservas de glucógeno mientras movilizan cantidades significativas de lípidos; otras especies como *T. mossambica* y *Notopterus notopterus* conservan parcialmente las reservas de glucógeno mientras metabolizan cantidades significativas de proteínas. Una estrategia alternativa, utilizada por ejemplo por *Ophiocephalus maculatus* y *E. lucius*, es la de conservar las proteínas y los lípidos y agotar parcialmente los depósitos de glucógeno. Finalmente, otras especies como *P. annectens*, *Anguilla anguilla* (anguila común) y *Anguilla rostrata* (anguila americana) parecen conservar los depósitos de glucógeno, mientras que metabolizan los almacenes lipídicos y/o proteicos. Incluso, se ha observado que una misma especie puede desarrollar diferentes respuestas dependiendo de la duración del periodo de ayuno, por ejemplo *O. kisutch* moviliza parcialmente las reservas hepáticas de glucógeno a corto plazo, mientras que a largo plazo moviliza los lípidos y las proteínas (Sheridan y Mommsen, 1991). Finalmente, una estrategia adaptativa, utilizada por la perca, es reducir el metabolismo al máximo hasta que aumenta de nuevo la disponibilidad de alimento (Foster y Moon, 1991).

Aunque existen numerosos trabajos que analizan el efecto de diferentes dietas sobre el crecimiento, la composición corporal y la utilización de energía por los peces, en general disponemos de mucha menos información relativa a las variaciones diarias y estacionales de las distintas reservas metabólicas. En el presente estudio se describen por primera vez importantes cambios estacionales en el contenido hepático y muscular de proteínas, lípidos y glucógeno, así como en la bioquímica plasmática de la tenca.

## 2.1. ÍNDICES BIOMÉTRICOS.

El índice nutricional (IN) en la población de tencas utilizadas por nosotros muestra variaciones anuales significativas, con los valores más elevados en primavera, coincidiendo con el mayor incremento del GSI debido a la maduración gonadal durante la época que precede a la freza. El IN de los peces está afectado por numerosos factores que varían de forma muy marcada a lo largo del año, como son la temperatura, el fotoperiodo, la nutrición, el estado reproductor y las interacciones sociales (Seddon y Prosser, 1997).

El hecho de que los HSI y GSI en la tenca (ambos mayores en las hembras que en los machos) muestren perfiles anuales inversos concuerda con la utilización de las reservas hepáticas para el desarrollo gonadal (Pinillos y cols., 2003). Se han descrito

resultados similares en *Sebastes flavidus* (Norton y MacFarlane, 1999) y en la *Perca flavescens* (Audet y Couture, 2003) y la trucha arcoiris (Bon y cols., 1997). En la tenca, el hígado va incrementando su masa de forma progresiva desde el periodo posterior a la freza, época en la que se produce un importante incremento en la ingesta, hasta alcanzar el máximo en invierno, patrón similar al descrito para *Salvelinus alpinus* (Jobling y cols., 1998). También en la lota se han descrito variaciones en el HSI a lo largo del ciclo reproductor, con los valores más elevados antes de la freza y los más bajos después de ésta (Mustonen y cols., 2002a,b).

Además de las variaciones anuales en el HSI hemos observado modificaciones estacionales en la composición del hígado, concretamente la cantidad de glucógeno y proteínas es superior en otoño e invierno. Esta diferente composición del hígado en función de las estaciones puede responder, además de a una distinta cantidad de alimento ingerido, a variaciones anuales en las presas que constituyen la dieta, ya que se ha demostrado que experimentalmente en el laboratorio se pueden lograr cambios en la composición del hígado de la tenca modificando la dieta (De Pedro y cols., 2001b). No hemos encontrado diferencias sexuales en dichas variaciones estacionales en la composición del hígado, si bien son más pronunciadas en las hembras, lo que puede justificarse, al menos en parte, por la producción hepática de vitelogeninas, como se ha sugerido en el caso de *O. mykiss* (Bon y cols., 1997) y confirma el bien conocido papel de este órgano en la vitelogénesis. El hígado de las hembras comienza la síntesis de proteínas varios meses antes de la maduración final del ovario que, en la tenca, tiene lugar al final de la primavera (Pinillos y cols., 2003). Los elevados niveles circulantes de proteínas en esta época del año en las tencas hembra corroboran esta propuesta.

Los cambios estacionales observados en el presente estudio en el HSI podrían estar relacionados, además de con la reproducción, con el estado nutricional. En alevines de tenca (De Pedro y cols., 2003) y en *O. kisutch* (Sheridan y Mommsen, 1991) el ayuno reduce dicho índice y la realimentación restablece los valores normales del peso del hígado. También en *D. labrax* se ha descrito una reducción en el HSI, además de en los índices gonadosomático y digestosomático, tras periodos de ayuno prolongados (Echeverría y cols., 1997). En estas condiciones de ayuno, el descenso en el HSI va acompañado de una reducción en el contenido hepático de glucógeno (Foster y Moon, 1991; Navarro y cols., 1992), lípidos (Woo y Cheung, 1981; Black y Skinner, 1987) o ambos (Hemre y cols., 1993).

## 2.2. PROTEÍNAS.

La concentración plasmática de proteínas totales es un parámetro muy útil para la evaluación del estado nutricional y de salud general de los peces (Řehulka, 1996, 1998). Las concentraciones circulantes de proteínas encontradas en el presente trabajo son similares a las descritas para esta misma especie por Svoboda y colaboradores (2001), que además describen diferencias sexuales en dichas concentraciones, con niveles más altos en las hembras que en los machos dos meses antes de la reproducción, coincidiendo con lo encontrado en la presente Memoria. Como en nuestro caso, estos mismos autores (Svobodová y cols., 1998) no hallaron dimorfismo sexual en las proteínas plasmáticas en la tenca inmediatamente antes de la reproducción, situación similar a la descrita en *E. lucius* (Pravda y cols., 1989). Por tanto, la existencia o no de dimorfismo sexual en este parámetro parece depender del momento del ciclo reproductor. No en todas las especies se ha observado una respuesta similar, por ejemplo en *S. salar* y *C. nasu* no parece haber diferencias sexuales en los niveles circulantes de proteínas totales (Luskova, 1997, 1998). No obstante, hay que tener en cuenta que posibles diferencias sexuales en las concentraciones plasmáticas de proteínas en los peces pueden quedar enmascaradas por factores como la variación estacional en la intensidad del metabolismo (Luskova, 1998; Edsall, 1999), el estado nutricional (Pravda y cols., 1989) o el estado de salud del pez (Řehulka, 1998). Por otro lado, aunque las tencas macho no experimentan cambios significativos estacionales en las proteínas totales circulantes, las hembras muestran valores más altos en invierno que en verano. Dicho incremento invernal de las proteínas plasmáticas en las hembras (estación en que las tencas no se alimentan) podría deberse al aumento de la síntesis hepática de proteínas, principalmente vitelogeninas que desde la circulación serán posteriormente incorporadas a las gónadas, contribuyendo al crecimiento de los ovocitos.

Como ya hemos comentado anteriormente un factor clave que determina a la proteinemia en ciertos peces es la ingestión de alimento (Luskova, 1997). El ayuno reduce las proteínas circulantes, si bien la duración del periodo de ayuno necesaria para observar dicha disminución es variable dependiendo de la especie (Shimeno, 1982; Heming y Paleczny, 1989). En general, este efecto es mucho más rápido en especies más activas, como *S. trutta* o *S. canicula*, mientras que en especies menos activas, como *C. carpio* o *A. anguilla* el periodo de ayuno necesario para inducir estos cambios es más largo. En *D. labrax* los niveles plasmáticos de proteínas totales no varían durante los 40 primeros días de ayuno, disminuyendo bruscamente para alcanzar el mínimo a los 50 días, momento a partir del cual vuelven a aumentar, lo que sugiere su papel como proteínas de reserva (Echeverría y cols., 1997). Según estos autores, el hecho de que a

los 50 días de ayuno las proteínas plasmáticas se reduzcan y las reservas de grasa estén prácticamente agotadas, promueve la movilización de proteínas tisulares, cuyos aminoácidos podrían ser usados como fuente de energía y para la síntesis hepática de nuevas proteínas plasmáticas. Esta síntesis hepática de proteínas podría explicar el incremento que observaron estos autores en los niveles de proteínas plasmáticas tras 50 días de ayuno, aunque tampoco descartan la posibilidad de que se deba a la hemoconcentración producida como consecuencia de la menor capacidad osmorreguladora que se da en estas condiciones de ayuno prolongado.

No obstante, algunos autores han sugerido que los cambios cíclicos en las proteínas sanguíneas son resultado de las reacciones “históricas” de los peces a los recurrentes cambios estacionales del ambiente, de forma que se producirían independientemente de la disponibilidad de alimento. La temperatura del agua es otro de los factores que pueden influir sobre la proteinemia. Así, en *Chrysophrys major* la concentración plasmática de proteínas se reduce notablemente a temperatura elevada, mientras que a temperatura baja permanecen constante (Woo y Murat, 1981). Por el contrario, en otras especies como *D. labrax*, la proteinemia no se modifica con los cambios en la temperatura del agua (Kavadias y cols., 2004).

El patrón estacional observado en el contenido de proteínas totales es netamente diferente en el hígado y el músculo de la tenca, probablemente debido a las distintas funciones metabólicas de ambos tejidos y a una distinta regulación del recambio proteico. En general la tasa de síntesis proteica es 10-20 veces mayor en el hígado que en el músculo blanco, pero la eficiencia en la acumulación de proteínas es menor (Peragón y cols., 1994). En el hígado la tasa de recambio proteico está controlada principalmente por la temperatura, el oxígeno disponible y la salinidad; en cambio en el músculo la síntesis de proteínas se correlaciona fundamentalmente con la alimentación (Fauconneau, 1985; Peragón y cols., 1994), incrementándose con mayores raciones de alimento y mostrando la mayor contribución a la pérdida de proteínas durante el ayuno (Houlihan y Laurent, 1987).

Este mayor recambio proteico asociado al mantenimiento de las funciones orgánicas frente al crecimiento en el hígado es más notable en situaciones de estrés nutricional, en las que algunas hormonas parecen estar mediando determinadas respuestas dirigidas al mantenimiento del metabolismo proteico hepático, especialmente hacia la síntesis de proteínas plasmáticas, en detrimento del crecimiento muscular. Esta regulación diferencial de las tasas de recambio proteico podría explicar el mayor contenido de proteínas del músculo ventral de la tenca durante el verano, cuando la

comida es abundante, mientras que en el hígado los valores más elevados se observan en las estaciones frías. Las proteínas musculares podrían ser movilizadas para satisfacer los requerimientos energéticos durante el invierno, cuando la disponibilidad de alimento es limitada. Esta hipótesis que se ajusta a nuestros resultados en la tenca ha sido sugerida por Arévalo y Durán (1988) para la trucha común (*Salmo trutta fario*), en la que también se describen variaciones estacionales en el contenido de proteínas musculares, paralelas a las variaciones en el contenido de lípidos, aunque cuantitativamente menos acusadas, con valores mínimos en enero y máximos en agosto. En *S. salar*, Nordgarden y colaboradores (2003) encuentran variaciones estacionales en el contenido muscular de proteínas, de forma que el agotamiento de las proteínas musculares coincide con periodos en los que la tasa de crecimiento es alta y, por tanto, el gasto energético es elevado. Berg y Bremset (1998) describen también en el salmón atlántico y en la trucha común una reducción en el contenido de proteínas (en el pez completo) inmediatamente después de la freza, coincidiendo con el descenso de la temperatura del agua.

Se ha propuesto que un incremento de la temperatura del agua provoca un mayor uso de los aminoácidos con fines energéticos y una disminución selectiva de la digestibilidad de éstos, lo que conduce a un desequilibrio en el conjunto de aminoácidos destinados a la síntesis de proteínas. Esta situación permite que una gran parte de los aminoácidos no pasen a formar parte de las proteínas y sean transformados en ácidos grasos y consecuentemente en triglicéridos (Martínez y cols., 1992). Nuestros resultados concuerdan con esta propuesta del efecto de la temperatura alta sobre la utilización de los aminoácidos dietarios, apoyándonos en el incremento de los triglicéridos plasmáticos en machos de tenca durante el verano y el elevado contenido de lípidos tanto en el hígado como en los dos tipos de músculo. Martínez y colaboradores (1992) también sugieren para *O. mykiss* que en estas condiciones los aminoácidos no se utilizan para la síntesis de proteínas sino para incrementar el peso corporal gracias a un aumento de la síntesis de grasa a partir de estos aminoácidos dietarios.

Los cambios estacionales en el contenido proteico muscular se han relacionado con la alimentación. En *G. morhua* las proteínas (sarcoplásmicas, estructurales y totales) en el músculo blanco aumentan desde verano hasta invierno (Martínez y cols., 1999), coincidiendo con una variación estacional paralela en la disponibilidad del alimento, elevada desde verano hasta finales de otoño, momento a partir del cual comienza a disminuir (Foster y cols., 1993b). También en la tenca encontramos un aumento progresivo desde el verano (abundancia de alimento) hasta el invierno en el contenido de proteínas del músculo dorsal. De forma complementaria, se ha sugerido que en *D. labrax*,

ante una situación de ayuno, se produce una primera fase en la que se movilizan las reservas grasas sin que se vea afectada la composición del músculo blanco, pero en una segunda fase del ayuno, cuando las grasas ya están agotadas, se compromete la composición del músculo blanco (Echevarría y cols. 1997). Esta ausencia de cambios en la composición del músculo blanco en *D. labrax* durante las primeras fases del ayuno ha sido descrita también por Gutiérrez y colaboradores (1991). No obstante, hay que tener presente que los peces en ayuno pueden regular a la baja su metabolismo y conservar sus sustratos entrando en una situación hipometabólica (Foster y Moon, 1991).

En cuanto a las posibles variaciones diarias del contenido de proteínas del hígado y del músculo dorsal no encontramos en la tenca cambios significativos a lo largo del día en ninguna de las estaciones del año. Si bien el músculo ventral muestra un ritmo diario de proteínas totales tanto en primavera como en invierno, con la acrofase al inicio de la fase luminosa y al final de la escotofase, respectivamente. En la tenca, las proteínas plasmáticas son muy estables, no mostrando variaciones diarias significativas. Este resultado coincide con la ausencia de ritmicidad en las proteínas totales de la lubina y la dorada (Pavlidis y cols., 1997). Por lo tanto, sugerimos que este parámetro puede ser utilizado como una herramienta útil para el análisis del estado fisiológico general en la tenca.

### 2.3. LÍPIDOS.

La principal fuente de energía en los peces son los lípidos, que muestran los cambios anuales más acusados de la composición corporal. Los teleósteos poseen varios sitios de almacenamiento de lípidos, siendo los principales el hígado, la grasa perivisceral y el músculo rojo. La relevancia de cada uno de estos almacenes lipídicos varía en función de distintos factores, como la especie, el tamaño del pez (Hemre y Sandnes, 1999), el estado de desarrollo (Sheridan, 1989) y los cambios cíclicos en funciones vitales, como la reproducción. Las tencas apenas almacenan grasa perivisceral, siendo el músculo ventral uno de los principales lugares de reserva de lípidos, ya que contiene aproximadamente 20 veces más lípidos que el músculo dorsal o el propio hígado. También en *S. alpinus* se ha señalado al músculo esquelético como el principal depósito de lípidos (Jorgensen y cols., 1997; Jobling y cols, 1998).

Los depósitos lipídicos del músculo ventral de la tenca experimentan importantes cambios anuales, con valores elevados en primavera y verano y muy bajos durante el invierno. Estos resultados coinciden con las variaciones en el contenido muscular de grasa descritas en la trucha común (*S. trutta fario*) (Arévalo y Durán, 1988) y en el pez

limón (*Sebastes flavidus*) (Norton y MacFarlane, 1999), pero difieren con el salmón atlántico, donde el contenido muscular de grasa es mayor en otoño (Mørkøre y Rørvik, 2001). Estudios recientes muestran la influencia del fotoperiodo en la regulación de la retención muscular de lípidos en el salmón atlántico, afectando no sólo al contenido medio sino también al patrón estacional (Nordgarden y cols, 2003). En la tenca observamos que el agotamiento de los lípidos del músculo ventral coincide con el periodo inmediatamente posterior a la freza. Además, la correlación inversa anual encontrada entre el contenido de lípidos del músculo ventral y el HSI, nos lleva a proponer que los lípidos musculares probablemente hayan sido movilizados hacia el hígado para su utilización ante la demanda energética que supone el periodo de freza. Nuestros resultados en la tenca concuerdan con los descritos en otras especies de teleósteos en las que durante la maduración gonadal se produce una movilización lipídica desde los tejidos de reserva (Black y cols., 1983; Nassour y Léger, 1989).

Es obvio que el crecimiento y maduración gonadales representa un reto importante para la homeostasis lipídica, ya que requiere el aporte de distintos constituyentes, fosfolípidos para el desarrollo de las membranas, colesterol como sustrato para la producción de los esteroides sexuales, y lípidos cuyos ácidos grasos esenciales son almacenados en los ovocitos (Loir, 1990). Los salmónidos son uno de los grupos de teleósteos mejor estudiados, habiéndose descrito en estos peces durante la maduración gonadal una movilización selectiva de los depósitos de lípidos almacenados en el tejido adiposo perivisceral (Nassour y Leger, 1989) y en el músculo (Pheger y cols, 1989). En *Oncorhynchus keta* se produce un importante agotamiento de las reservas de triglicéridos durante la migración reproductora (Henderson y Tocher, 1987), los triglicéridos almacenados en el músculo son utilizados como fuente de energía, mientras que su biosíntesis hepática cesa (Ando y cols., 1996). Además, durante la migración reproductora se produce un cambio en la composición de los triglicéridos del músculo dorsal, debido a una movilización preferencial de ciertos triglicéridos, lo que sugiere que la utilización del depósito de triacilglicerol varía en función de la estructura esteroespecífica de los mismos (Ando y cols., 1996).

La movilización de los almacenes lipídicos en los peces parece tener una doble finalidad, por un lado, y como acabamos de plantear, aportar los sustratos energéticos necesarios para la recrudescencia gonadal, y por otro, satisfacer las demandas metabólicas durante las estaciones frías, en las que se reduce notablemente la disponibilidad de alimento (Jobling y cols., 1998; Hutchings y cols., 1999). Así, se han relacionado cambios estacionales en las reservas lipídicas con las situaciones de ayuno

que se producen en condiciones naturales. Tras largos periodos de ayuno los peces muestran hiperlipidemia, concomitante a una actividad lipolítica (niveles de triacilglicerol lipasa) elevada en el hígado, si bien este incremento se revierte después de 1 semana de realimentación (Sheridan y Mommsen, 1991). En *O. kisutch*, durante las primeras fases de ayuno, se produce la movilización parcial del glucógeno hepático, lo que se traduce en una hiperglucemia. En fases avanzadas de ayuno cesa la movilización de los depósitos de glucógeno del hígado, conservándose una glucemia similar a la de salmones alimentados, y se movilizan las grasas, aumentando los niveles de ácidos grasos circulantes. Harmon y Sheridan (1992) han sugerido que los niveles plasmáticos de insulina, glucagón y el péptido similar al glucagón disminuyen durante el ayuno, siendo esta disminución mucho más marcada en el caso de la insulina, lo que determina que el cociente insulina/glucagón disminuya, favoreciéndose así la lipólisis.

Los niveles circulantes de lípidos y lipoproteínas vienen determinados además de por factores dietarios, por numerosos factores ambientales que pueden producir cambios estacionales significativos (Grundy y Denke, 1990; Wallaert y Babin, 1994). Los triglicéridos encontrados en la tenca, aún a pesar de las diferencias entre sexos, son menores a los descritos en otras especies de teleósteos como la trucha arcoiris (Bon y cols., 1997). Además, muestran una notable variación estacional, con niveles plasmáticos elevados durante el verano y mínimos en el invierno. Esta diferencia estacional se correlaciona de forma negativa con el HSI en ambos sexos y con el GSI en las hembras, confirmando la interacción funcional entre hígado-reservas-gónadas discutida con anterioridad. El aumento de la ingesta tras la freza, cuando hay abundancia de alimento disponible, justifica esta recuperación de los triglicéridos circulantes durante el verano. En la trucha arcoiris, Bon y colaboradores (1997) también describen una movilización de las reservas de grasa mesentérica para satisfacer los costes energéticos del desarrollo gonadal, acompañado de un descenso en el índice viscerosomático unos meses antes de la época de freza (Schwalme y cols., 1993). Este descenso coincide con un aumento en el GSI, de modo que aunque la mayor parte de los triglicéridos están siendo utilizados como fuente de energía, una parte sustancial de éstos se dirige hacia el hígado para la síntesis de lipoproteínas que serán incorporadas por el ovario en desarrollo dada la gran demanda de ácidos grasos durante la recrudescencia gonadal (MacFarlane y cols., 1993). Además, Svoboda y colaboradores (2001) sugieren que en la tenca durante el verano se incrementa la tasa metabólica, y por tanto las necesidades energéticas. El aumento en los triglicéridos circulantes que hemos observado en nuestro estudio en esta época del año podría también estar asociado con las elevadas temperaturas de esta estación.



Los niveles plasmáticos de colesterol en la tenca, que oscilan entre 50 y 125 mg/dl, también son inferiores a los encontrados en la trucha arcoiris (250-550 mg/dl) (Bon y cols., 1997), y muestran diferencias sexuales únicamente después de la reproducción, coincidiendo con los resultados de Svoboda y colaboradores (2001) en esta misma especie. Este dimorfismo sexual es fácilmente justificable en base a la mayor demanda de lípidos, tanto triglicéridos como colesterol, necesarios para la maduración gonadal en las hembras.

De forma similar a lo discutido para los triglicéridos, la correlación negativa existente entre el colesterol circulante y el HSI induce a pensar que el incremento en este índice podría realizarse a costa, al menos en parte, de los triglicéridos y el colesterol circulantes. La disminución en el colesterol plasmático en invierno también puede justificarse en base a su utilización como sustrato de la biosíntesis de esteroides, principalmente de 17- $\beta$ -estradiol, que muestra un pronunciado perfil estacional en esta especie (Pinillos y cols., 2003). Además, el descenso del colesterol puede también deberse a la utilización de este tipo de lípidos para la formación de las membranas celulares que se realiza a tasas elevadas durante los últimos estados de la maduración gonadal (Dannevig y Norum, 1982). En la tenca hemos observado un ligero incremento, no significativo, en los niveles plasmáticos de colesterol tras la freza. Algunos autores (White y cols., 1986; Bon y cols., 1997) sugieren que este ligero incremento posterior a la freza podría estar reflejando la reabsorción gonadal que se produce de aquellos ovocitos que no han sido liberados y permanecen en el ovario en forma atrésica (Pinillos y cols., 2003). Además, también concuerda con la movilización lipídica observada en otoño tanto desde el hígado (principalmente en las hembras) como desde el músculo.

Finalmente, hay que indicar que en la regulación del colesterol circulante intervienen otros factores, tanto propios del animal (edad, sexo) como ambientales (fotoperíodo, temperatura, estado nutricional) (Babin y Vernier, 1989; Wallaert y Babin, 1994; Echeverría y cols., 1997). En la tenca, por ejemplo el índice nutricional está claramente correlacionado de forma positiva con el colesterol circulante, revelando que el estado nutricional determina la colesterolemia en esta especie.

Las concentraciones circulantes de triglicéridos siguen un ritmo diario en la tenca que, como en el caso de la glucosa, sólo es significativo en invierno, con los valores más elevados al inicio de la escotofase y desplazado 5 horas respecto al ritmo de glucosa. En pargos mantenidos en condiciones de oscuridad constante los niveles circulantes de triglicéridos y colesterol muestran un ritmo diario invertido al ritmo de actividad, y que sugiere que la lipólisis en esta especie presenta una ritmicidad diaria con máximos

durante la noche (Pavlidis y cols., 1999a). En otras especies con patrones de alimentación diurnos, incluyendo humanos, se han registrado resultados similares para las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados (Boujard y Leatherland, 1992a). Los perfiles similares de los ritmos diarios de triglicéridos y glucosa (discutidos más adelante) en la tenca sugieren que las respuestas de los sistemas circadianos a los cambios estacionales en relación al metabolismo lipídico y de carbohidratos son similares en esta especie. Finalmente, queremos añadir que se ha descrito la existencia de ritmos semilunares para los triglicéridos y el colesterol circulante en peces (Leatherland y cols., 1992), que afectan de forma diferente a ambos tipos de lípidos (el máximo de triglicéridos se produce 4-5 días después, y el de colesterol 4-5 días antes, de las fases de luna nueva y luna llena). En nuestro estudio no tuvimos en cuenta las fases de la luna por lo que no podemos hacer comparaciones. Obviamente, este interesante aspecto necesita ser investigado en profundidad a fin de conocer la importancia del ciclo lunar como zeitgeber en la expresión de los ritmos diarios y estacionales del metabolismo lipídico.

#### **2.4. CARBOHIDRATOS.**

En comparación con lo que sucede en los mamíferos, la utilización de los hidratos de carbono por los peces es un proceso muy deficiente y, de hecho, la contribución de los carbohidratos a la masa corporal y a las reservas energéticas en estos vertebrados es minoritaria en comparación con la contribución de los otros dos tipos de macronutrientes. Sin embargo, los carbohidratos procedentes de la dieta que no son usados como fuente energética se pueden almacenar en el hígado y en el músculo en forma de glucógeno o, tras su conversión, en forma de lípidos (Brauge y cols., 1994). Ante una demanda energética, por ejemplo para la contracción muscular, el glucógeno es metabolizado en glucosa, que es transportada en el torrente sanguíneo hasta el músculo, donde puede ser utilizada, o bien almacenada de nuevo en forma de glucógeno.

En algunas especies de teleósteos, como *O. mykiss*, los carbohidratos son la primera reserva utilizable durante periodos de ayuno, de forma que, ante cortos periodos de ayuno (alrededor de una semana de duración), la glucemia se conserva gracias a la movilización del glucógeno hepático. No obstante, las reservas de glucógeno son limitadas, y si el periodo de ayuno se prolonga (más de tres semanas) acaban por reducirse los niveles de glucosa circulantes (Tranulis y cols., 1991), a menos que se produzca un incremento compensatorio de la gluconeogénesis dirigida a mantener la glucemia (Baanante y cols., 1991; Sheridan y Mommsen, 1991). En la tenca, el hígado parece ser un importante órgano de reserva de glucógeno, y exhibe notables cambios

estacionales en ambos sexos. Las reservas de glucógeno hepático en la tenca se agotan durante el invierno y se reponen en verano, muy probablemente gracias a la elevada disponibilidad de alimento en esta época del año. Este planteamiento se apoya en resultados previos obtenidos en tenca, en los que encontramos una reducción del contenido de glucógeno hepático producida por el ayuno, que se revierte parcialmente tras la realimentación (De Pedro y cols., 2003). También en *O. kisutch* (Sheridan y Mommsen, 1991) y en *S. trutta* (Navarro y cols., 1992) disminuye el glucógeno hepático al someter a los peces a condiciones de ayuno. Una síntesis rápida de glucógeno hepático como respuesta a la realimentación y una recuperación de los niveles plasmáticos de glucosa también se han demostrado en otros teleósteos (García de Frutos y cols., 1991; Navarro y cols., 1992).

Desde un punto de vista cuantitativo, la reserva de glucógeno en el hígado de la tenca es muy superior a la reserva muscular, aún a pesar de que el músculo dorsal contiene aproximadamente 10 veces más glucógeno que el ventral. En la actualidad ignoramos la utilización que realiza la tenca de estas reservas de glucógeno muscular, y el significado del distinto perfil estacional de este carbohidrato en ambos tipos de músculo, pero resulta interesante comparar la diferente contribución de cada uno de los dos tipos de músculo a las reservas metabólicas en esta especie. Así, mientras que el músculo dorsal, además de proteínas almacena importantes cantidades de glucógeno, el músculo ventral es almacén principal de lípidos. La tesis de que el músculo es un tejido postmitótico que no contribuye de forma significativa al metabolismo energético no puede ser aplicada a los peces, ya que éstos presentan un crecimiento indefinido, una rápida movilización de proteínas musculares y una cantidad de músculo relativamente elevada. Además, aunque la tasa de síntesis proteica en el músculo blanco es mínima comparada con la del hígado, su gran volumen, así como su alto contenido en proteínas, hacen que en conjunto la contribución del músculo como reserva proteica sea mayor, correlacionándose mejor con la tasa de crecimiento global del pez (Houlihan y Laurent, 1987).

En relación con la glucemia, las concentraciones medias de glucosa encontradas en la tenca en el presente estudio son similares a las descritas para otras especies de teleósteos (Cerdá-Reverter y cols., 1998), y muestran, en ambos sexos, marcadas variaciones anuales. Los niveles plasmáticos de glucosa pueden variar dependiendo de múltiples factores, entre los que el estado nutricional, el estrés de la captura y manipulación del animal, posibles estados patológicos, la temperatura del agua y la dieta, son los más investigados.

En la tenca, el hecho de que la glucosa circulante sea elevada en verano y otoño y significativamente menor en primavera e invierno induce a pensar en una relación de dependencia de este parámetro y la alimentación estacional en esta especie. La respuesta de los peces, en relación con los niveles plasmáticos de glucosa, a periodos de ayuno es muy variable dependiendo de la especie (herbívora o carnívora) y del tiempo de duración del ayuno. Así, tras periodos de ayuno prolongados (7 semanas) se ha descrito hipoglucemia en perca (Foster y Moon, 1991), trucha (Navarro y cols., 1992), salmón y bacalao (Sundby y cols., 1991). En especies como *Anguilla rostrata* (Suárez y Mommsen, 1987) y *Clarias lazera* (Navarro y Gutiérrez, 1995) la glucemia no se modifica después de varias semanas de ayuno, sin embargo periodos cortos de ayuno (7 días) provocan un incremento significativo en los niveles plasmáticos de glucosa en *O. kisutch*, efecto que se revierte tras 2 semanas de realimentación (Sheridan y Mommsen, 1991). En otras especies, como *Rhamdia hilarii* (Machado y cols., 1988) la glucosa circulante se reduce al 50% tras 30 días de ayuno. En *D. labrax* sometidos a 10-40 días de ayuno se produce una hipoglucemia moderada (Echeverría y cols., 1997). En este mantenimiento de la glucemia durante el ayuno, a corto plazo interviene la movilización del glucógeno hepático, y posteriormente la activación de la gluconeogénesis (De la Higuera y Cárdenas, 1984) y la reducción de la tasa de utilización de la glucosa (Moon y Foster, 1995).

A partir de esta variedad de posibilidades, nuestros datos en la tenca se aproximan a los de las especies en las que se produce una hipoglucemia asociada a la reducción de la ingesta de alimento, y una recuperación en verano, en etapas de una alimentación incrementada. Aunque exista un proceso de gluconeogénesis a partir de precursores lipídicos durante el invierno no debe ser lo suficientemente importante para compensar el efecto de agotamiento de las reservas de carbohidratos. Datos previos realizados por nuestro grupo de investigación en alevines de tenca demuestran que tras una semana de ayuno se produce una reducción importante de la glucemia, del contenido hepático de glucógeno, así como del HSI (De Pedro cols., 2003), lo que parece reflejar una estrategia similar a la descrita para periodos de ayuno prolongados, como los que se producen en condiciones naturales.

No hemos encontrado diferencias estadísticas en los niveles plasmáticos de glucosa entre machos y hembras en ninguna de las estaciones del año. Esta falta de dimorfismo sexual coincide con los resultados de Svoboda y colaboradores (2001) en esta misma especie, que no detectan diferencias relacionadas con el sexo ni antes ni después de la freza, y también con los resultados descritos para otras especies de peces

(Bhatnagar y Saksena, 1989; Edsall, 1999). Por lo que la glucemia y el ciclo reproductor no parecen tener una clara dependencia en estas especies.

Oscilaciones en la concentración de distintos metabolitos circulantes se han descrito a lo largo de ciclos de 24 horas en varias especies de teleósteos (*C. auratus*, Delahunty y cols., 1978; *D. labrax*, Pérez y cols., 1988; *O. mykiss*, Laidley y Leatherland, 1988; Holloway y cols., 1994; Cerdá-Reverter y cols., 1998), habiéndose propuesto una sincronización de estos ritmos tanto por la hora de la alimentación como por el ciclo luz/oscuridad (Boujard y Leatherland, 1992b; Meier, 1992; Spieler, 1992). En el caso concreto de la glucosa plasmática la mayoría de los estudios muestran incrementos rápidos de este carbohidrato tras la ingestión de alimento, que retoman lentamente a los niveles de pre-alimentación, con lo que se acepta que la hora de alimentación actúa como un potente “zeitgeber” sincronizando el ritmo diario de glucosa sanguínea.

En la tenca, estudios previos coinciden con este patrón clásico, un ritmo diario de glucosa circulante con la acrofase situada 4 h después de la hora de alimentación (y coincidiendo con el mediodía), y un descenso progresivo a partir de ese momento (De Pedro y cols., 1998b). Los resultados presentes en la tenca revelan una mayor complejidad, ya que el perfil diario de los niveles de glucosa plasmática varía con las estaciones. Curiosamente, la oscilación diaria es estadísticamente significativa únicamente durante el invierno, pero no en las restantes estaciones. El hecho de que en nuestro diseño experimental las tencas estuvieron expuestas a 24 h de ayuno antes del muestreo, podría justificar la pérdida del ritmo diario significativo en primavera, verano y otoño, por falta del sincronizador. Sin embargo no explica la ritmicidad diaria de glucosa circulante en invierno, estación en que las tencas, aún teniendo alimento disponible, no lo consumen (Guijarro y cols., 1999). La principal diferencia entre el invierno y las restantes estaciones se refiere a la duración del ayuno (al menos un mes frente a 24 h), y nos induce a pensar que probablemente la supresión del “zeitgeber” el día previo altere la ritmicidad diaria de glucosa circulante, mientras que en el invierno la sincronización no se realizaría, obviamente, por la ingestión de alimento, sino por otros parámetros endógenos relacionados, que fluctúan rítmicamente, como el glucógeno hepático o el muscular (resultados en la presente Memoria). En este sentido, se ha demostrado que la imposición de un horario de alimentación altera y puede incluso eliminar las fluctuaciones diarias de algunos parámetros fisiológicos en los peces, incluyendo la glucemia (Boujard y Leatherland, 1992a). En otras especies, como la lubina (Cerdá-Reverter y cols., 1998), el pargo (*Pagrus pagrus*) (Pavlidis y cols., 1999a) y el dentón (*Dentex dentex*) (Pavlidis y cols., 1999b) el ritmo diario de glucosa plasmática parece ser independiente del momento

de la alimentación, y podría ser un reflejo de cambios en la producción hepática de glucosa y/o en la tolerancia a la glucosa. Hay que tener en cuenta que dicha tolerancia puede ser resultado de distintos procesos, como una mayor secreción de insulina, un incremento en el transporte de glucosa no mediado por insulina, y/o una mayor disponibilidad y sensibilidad de los receptores de esta hormona. En la tenca el ritmo diario del contenido hepático de glucógeno en invierno tiene la acrofase aproximadamente 2 h antes que el ritmo de glucosa, lo que podría estar indicando que la glucemia, al menos durante el invierno, depende de la producción de glucosa derivada de la glucogenolisis hepática.

El hecho de que en la tenca el perfil diario del ritmo de glucosa cambie en las distintas estaciones sugiere un posible papel del fotoperiodo en la modulación de dicho ritmo. Así, existen datos que señalan a este factor ambiental como una variable importante en la determinación de los diferentes parámetros que definen la oscilación del ritmo diario de glucosa plasmática. En lubinas mantenidas bajo fotoperiodo 15L:9D se observa un ritmo diario significativo de glucosa plasmática con la acrofase al final de la escotofase (Cerdá-Reverter y cols, 1998). La amplitud de este ritmo disminuye cuando se expone a los peces a un fotoperiodo 9L:15D, además de producirse un cambio en la acrofase. En pargos mantenidos a temperatura constante y fotoperiodo 12L:12D ó 8L:16D el ritmo diario de glucosa circulante tiene valores más bajos en la primera parte de la escotofase y el periodo previo al amanecer y los valores más elevados 8-12 horas después del amanecer (Pavlidis y cols., 1999a). Estos máximos de glucosa plasmática no parecen ser un reflejo de la absorción de glucosa en el tracto gastrointestinal, sino que parecen estar sincronizados principalmente por la alternancia luz/oscuridad, ya que desaparecen en condiciones DD. Se han descrito resultados similares en truchas arcoiris mantenidas bajo dos fotoperiodos diferentes, 8L:16D y 12L:12D, y alimentadas mediante comederos a demanda (Boujard y Leatherland, 1992a; Boujard y cols., 1993), y en lubinas mantenidas bajo fotoperiodo 12L:12D y con restricción del alimento (Pavlidis y cols., 1997). Necesariamente, se requiere una importante investigación adicional para dilucidar la importancia relativa de estos y otros posibles sincronizadores.

### 3. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES EN EL CONTENIDO HIPOTALÁMICO Y TELENCEFÁLICO DE NPY Y MONOAMINAS Y EN LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GHRELINA Y LEPTINA EN *Tinca tinca*.

#### 3.1. NPY.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la implicación del NPY en la regulación central de la ingesta, ejerciendo un potente efecto orexigénico en muy diversas situaciones y especies (Leibowitz, 1995; Levine y Billington, 1997; López-Patiño y cols., 1999; De Pedro y cols., 2000; Narnaware y Peter, 2001a). El hecho de que tanto el ayuno agudo como el prolongado incrementen el contenido hipotalámico de NPY en roedores (Mercer y cols., 1995; Yoshihara y cols., 1996), y su expresión génica en el hipotálamo de rata (Schwartz y cols., 1993; Mercer y cols., 1996) y de teleósteos (Silverstein y cols., 1998; Narnaware y Peter, 2001b) ha llevado a sugerir que el NPY interviene en la estimulación de la ingesta inducida por ayuno en ambos grupos de vertebrados, mamíferos y peces.

La tenca es una especie que en condiciones naturales experimenta cambios estacionales significativos en su ingestión de alimento, produciéndose una disminución muy importante de la ingesta, que alcanza prácticamente la supresión total, en peces expuestos a temperaturas bajas (Guijarro y cols., 1999). Por tanto, y si la propuesta anterior se cumple para la tenca cabría esperar que el contenido de NPY experimentase cambios estacionales. Efectivamente, nuestros resultados revelan que existe una variación estacional en el contenido hipotalámico de este neuropéptido, con los niveles más elevados en noviembre, cuando la ingesta es muy baja y los menores niveles anuales en el mes de agosto, cuando su alimentación es mayor. Además, en nuestro estudio encontramos que, tras el incremento observado de noviembre, hay una reducción del NPY hipotalámico en el muestreo realizado en febrero. Dicha reducción de NPY en febrero podría justificarse con los datos publicados por Koskela y colaboradores (1997) que describen que tras la disminución inicial de la ingesta y el peso corporal en peces expuestos a bajas temperaturas, al cabo de varias semanas de exposición al frío se produce un aumento compensatorio de la alimentación. Así, el incremento observado en noviembre podría corresponder al periodo de exposición inicial a las bajas temperaturas (otoño), y el descenso de NPY en invierno estaría asociado a una fase de realimentación. Esta hipótesis no ha podido ser corroborada en el sargo picudo (*Diplodus puntazzo*), donde el contenido hipotalámico de NPY no se modifica tras dos semanas de ayuno. No obstante, los autores de este estudio cuestionan si este periodo de ayuno es insuficiente para producir cambios ostensibles del NPY en esta especie (Vera y cols., 2004b).

Otro factor relacionado con el contenido encefálico de NPY en los mamíferos es la alteración aguda y/o crónica de la composición de la dieta (Beck y cols., 1990, 1992; Leibowitz, 1995; Stricker-Konrad y cols., 1998), pudiendo el NPY controlar de forma específica la ingesta de determinados nutrientes. Así, la administración a nivel central de este neuropéptido en ratas incrementa preferentemente la ingestión de carbohidratos, y en menor medida, y de forma transitoria, la de grasas (Stanley y cols., 1985; Smith y cols., 1997). Por otra parte, se ha encontrado una fuerte correlación positiva entre la ingesta de carbohidratos, más concretamente la relación carbohidratos/grasas, y el contenido de NPY en ciertos núcleos hipotalámicos, principalmente en el NPV (Leibowitz, 1995). En los peces, concretamente en *C. auratus*, la expresión génica de NPY en el hipotálamo aumenta después de una semana de alimentación con dietas de elevado contenido en carbohidratos y grasas, pero no con alto contenido proteico, revirtiéndose este patrón después de 4 semanas (Narnaware y Peter, 2002). Por tanto, la variación estacional de la disponibilidad relativa de las diferentes presas que componen la dieta de una determinada especie, que se traduce en importantes cambios estacionales en la composición de nutrientes, podría afectar al contenido encefálico de NPY. Un buen ejemplo de esta estacionalidad lo encontramos en la lubina, que puede alimentarse de una amplia variedad de presas, y cuya dieta cambia su composición estacionalmente, llegando incluso a invertir su ritmo de alimentación en función del momento del año (Picket y Pawson, 1994). Desafortunadamente no se ha analizado, hasta la fecha, el contenido encefálico de NPY en esta especie. En la actualidad ignoramos si la tenca en condiciones naturales modifica su dieta estacionalmente, lo que podría influir en los cambios observados en el contenido hipotalámico de NPY. Sin embargo, en nuestro estudio las tencas se alimentaron con la misma dieta comercial en todos los puntos de muestreo, si bien no podemos descartar que, puesto que se mantuvieron en tanques al aire libre, tuviesen acceso a diferentes presas naturales en las distintas estaciones del año.

El NPY muestra una amplia distribución por todo el sistema nervioso central de vertebrados; los análisis de localización de inmunorreactividad para NPY en peces revelan una alta densidad en el telencéfalo y en el hipotálamo (*C. auratus*, Pontet y cols., 1989, Peng y cols., 1994; *O. mykiss*, Danger y cols., 1991; *O. tshawytscha* y *O. kisutch*, Silverstein y cols., 1998; *D. labrax*, Cerdá-Reverter y cols., 2000b; *Solea senegalensis*, Rodríguez-Gómez y cols., 2001), por lo que éstas fueron las áreas elegidas en el presente estudio. Al comparar el contenido de NPY en el hipotálamo con los valores hallados en el telencéfalo encontramos que en todas las estaciones los valores son superiores en el telencéfalo, llegando incluso a triplicar al contenido hipotalámico en



agosto. Este resultado coincide con un estudio previo en *C. auratus*, en el que se cuantifica también por RIA el contenido de NPY en distintas regiones encefálicas, encontrando en el telencéfalo valores muy superiores a los del resto de regiones analizadas (Pontet y cols., 1989), si bien no es posible hacer una comparación directa entre estos resultados (expresados en ng/mg prot) y los nuestros (expresados en ng/telencéfalo). Un estudio posterior en el que se determina la expresión génica del NPY en distintas áreas encefálicas del carpín describe que el telencéfalo-área preóptica presenta los niveles más elevados de ARNm de NPY (aproximadamente 5 veces superiores a los del techo óptico-tálamo) (Narnaware y cols., 2000).

El hecho de que no encontremos el mismo perfil estacional en ambas regiones podría estar sugiriendo diferentes funciones del NPY en ambas localizaciones encefálicas. Pruebas a favor de esta posibilidad las encontramos en varios estudios que apuntan a una funcionalidad diferencial del NPY en las distintas regiones encefálicas. Así, Silverstein y colaboradores (1998) encuentran que el ayuno incrementa la expresión del ARNm de NPY en el área preóptica hipotalámica, pero no en el área caudoventral telencefálica del salmón. En un estudio muy reciente realizado en *C. carpio* también se describen diferencias en la respuesta de las neuronas NPYérgicas telencefálicas e hipotalámicas frente al mismo estímulo, de modo que mientras que las neuronas del telencéfalo-área preóptica que expresan NPY responden al aumento de los niveles plasmáticos de cortisol con un incremento en la expresión del ARNm del NPY, en otras áreas del hipotálamo las neuronas NPYérgicas no se ven afectadas por este incremento de cortisol (Bernier y cols., 2004). Esta distinta respuesta también se produce para los esteroides sexuales, así en *C. auratus* el pretratamiento durante 5 días con esteroides ováricos (estradiol y testosterona) induce un incremento de 2-3 veces en los niveles de ARNm de NPY en el telencéfalo-área preóptica pero no en el techo óptico-tálamo (Peng y cols., 1994). Una respuesta diferencial de distintas áreas encefálicas se ha descrito también para otros péptidos reguladores del apetito en peces, como el CRF (Bernier y cols., 1999; Bernier y Peter, 2001) y la CCK en *C. auratus* (Peyon y cols., 1999).

Análisis autorradiográficos de los sitios de unión de NPY en el cerebro de *C. carpio* apuntan a que el NPY en el telencéfalo-área preóptica estaría implicado en el procesamiento de las entradas olfatorias y en comportamientos más complejos como la adquisición y retención del aprendizaje espacial e incluso la modulación de la actividad de neuronas GnRH presentes en el área preóptica (Pirone y cols., 2003), mientras que en el hipotálamo el NPY puede estar modulando la ingesta o la integración de la información fótica para el marcapasos central, como sucede en los mamíferos. Las correlaciones

halladas en nuestro estudio entre el contenido de NPY y ciertos índices biométricos apoyan también para la tenca esta diferente función del NPY en el hipotálamo y el telencéfalo. De hecho, el contenido hipotalámico de NPY se correlaciona de forma negativa únicamente con el índice nutricional en los machos, mientras que el contenido telencefálico se correlaciona negativamente, tanto en machos como en hembras, con el IN y los pesos del hígado, las gónadas y los depósitos de grasa perivisceral.

Algunos estudios han sugerido la influencia del fotoperiodo sobre el sistema NPYérgico, implicando a este neuropéptido en los cambios de ingesta inducidos por modificaciones del fotoperiodo. Sin embargo, la escasez de trabajos a este respecto, así como la disparidad de núcleos encefálicos concretos estudiados en cada uno de ellos, no permite extraer una conclusión clara sobre las acciones del NPY como transductor de la información fotoperiódica. Así, en el hámster sirio los fotoperiodos cortos incrementan el número de neuronas NPY-ir en la hoja intergeniculada que proyecta fibras al NSQ (Jacob y cols., 1998). Sin embargo, en el hámster siberiano el NPY no parece participar en la reducción de la ingesta a largo plazo que se produce como consecuencia de la exposición a fotoperiodos cortos, ya que los niveles de expresión de este péptido en el hipotálamo sólo disminuyen ligeramente respecto a los controles mantenidos en fotoperiodos largos (Reddy y cols., 1999); si bien en este último estudio se investiga la expresión del mensajero en un núcleo distinto, el ARC. Por tanto, se ha propuesto que en algunos casos, como el del hámster siberiano, el NPY estaría más bien implicado en los mecanismos homeostáticos agudos que operan tanto en fotoperiodos cortos como largos. De forma general se admite que los estimuladores de la ingesta son más efectivos en fotoperiodos largos, mientras que los inhibidores lo son en fotoperiodos cortos (Bartness y cols., 1986, 1995; Rousseau y cols., 2002), de modo que en condiciones de fotoperiodos cortos se requerirían mayores niveles de agentes orexigénicos que en fotoperiodos largos. Nuestros resultados estacionales en la tenca apoyan esta hipótesis. En agosto se reduce notablemente el contenido hipotalámico de NPY, mientras que en noviembre dicho contenido experimenta un marcado ascenso. Sin embargo, esta hipótesis no parece cumplirse en el caso de NPY en todas las especies estudiadas. Por ejemplo, la potencia de la estimulación de la ingesta por NPY en el hámster siberiano no depende del fotoperiodo (Boss-Williams y Bartness, 1996), sin embargo en el gorrión corona blanca (*Zonotrichia leucoprys gambelii*) la sensibilidad al efecto orexigénico del NPY es mayor en fotoperiodos largos (Richardson y cols., 1995). En *Phodopus sungorus* los cambios de fotoperiodo no afectan a la expresión del ARNm del NPY en el ARC (Mercer y cols., 1995), no existiendo diferencias entre los hámsters mantenidos durante 18 semanas en 16L:8D y aquellos mantenidos en 8L:16D. Por tanto, y con esta variedad

de respuestas, tenemos que afirmar que la expresión de los ritmos estacionales de NPY depende de la especie, del área encefálica y del núcleo hipotalámico investigado.

Además del papel directo del fotoperiodo en el control de los cambios estacionales del NPY, algunos estudios realizados en mamíferos indican que los cambios estacionales en los niveles circulantes de varias hormonas, principalmente esteroides sexuales pueden intervenir en la regulación estacional del NPY. Así, en el jerbo (*Jaculus orientalis*) se han descrito variaciones estacionales en la densidad de fibras NPY-ir en el NSQ (Lakhdar-Ghazal y cols., 1995), mostrando valores más elevados en otoño (periodo de reposo sexual, con baja actividad testicular y reducidos niveles de testosterona circulantes) que en primavera-verano (periodo de cría). Estas variaciones están moduladas tanto por el fotoperiodo como por la testosterona, pero a través de mecanismos independientes (Oukouchoud y cols., 2003; Dobbins y cols., 2004). En la tenca hemos observado un descenso importante en el contenido hipotalámico de NPY en agosto, coincidiendo con niveles elevados de testosterona tanto en machos como en hembras (Pinillos y cols., 2003), y un posterior aumento en otoño, cuando los niveles de esteroides gonadales son bajos y el fotoperiodo es más corto, de modo que las variaciones estacionales de NPY pueden explicarse, al menos en parte, por una posible acción inhibitoria de la testosterona sobre las neuronas NPYérgicas hipotalámicas. No obstante, para poder discriminar entre los efectos debidos al fotoperiodo y los debidos a los esteroides sexuales habría que realizar una experimentación adecuada, individualizando ambos factores, por ejemplo mediante la administración de hormonas sexuales a peces mantenidos bajo fotoperiodos cortos o realizando gonadectomías en animales mantenidos en fotoperiodos largos.

La complejidad de la regulación del NPY encefálico por los esteroides gonadales es aún mayor, dependiendo de si se trata de especies reproductoras estacionales o no, siendo además, muy variables los efectos de los esteroides gonadales sobre el sistema NPYérgico en los mamíferos estudiados, dependiendo del área encefálica. Así, mientras que en el núcleo ARC testosterona y estradiol activan la expresión génica y la producción de NPY, en otras áreas como el área preóptica medial o la eminencia media los resultados son divergentes, e incluso en otras áreas, como el NPV los esteroides no parecen tener efecto sobre el NPY (Leibowitz, 1995). Una cuestión relacionada con este aspecto, y que apenas se ha investigado, es el posible dimorfismo sexual del NPY encefálico. En nuestro estudio en la tenca el contenido hipotalámico de NPY no presenta dimorfismo sexual, resultado similar al descrito en ratas, donde los niveles medios de expresión génica de NPY en el ARC son similares en machos y hembras (Urban y cols.,

1993). La posible existencia de dimorfismo sexual del sistema NPY-érgico no se ha estudiado en otros peces, pero otros neuropéptidos igualmente implicados en la regulación de la ingesta tampoco muestran dicho dimorfismo. Así, por ejemplo, la expresión génica de la CCK en el hipotálamo de *C. auratus* no presenta dimorfismo sexual en ninguno de los estados del ciclo sexual (Peyon y cols., 1999).

Otro factor ambiental periódico, también relacionado con la ingestión de alimento es la temperatura. En los mamíferos existe un único estudio, realizado en rata, en el que se investiga esta cuestión. La exposición prolongada al frío incrementa la ingesta pero no modifica ni el contenido hipotalámico de NPY ni la expresión de su mensajero (Bing y cols., 1998). Esta respuesta del NPY tiene un importante valor adaptativo, ya que un hipotético aumento del neuropéptido podría inhibir la termogénesis causando una hipotermia potencialmente letal. Se ha sugerido que el incremento de la ingesta inducido por la exposición crónica a bajas temperaturas no está mediado por NPY, sino que deben existir otras vías neuronales que activen esta hiperfagia (Bing y cols., 1998).

Aún nos encontramos en una fase inicial del conocimiento de la ritmicidad anual de reguladores del apetito, pero en el caso del NPY, dado que el sistema NPYérgico está regulado por múltiples señales, como los esteroides adrenales y gonadales, insulina, señales metabólicas y otros neuropéptidos (Leibowitz, 1995), muy probablemente en la expresión del ritmo anual del neuropéptido intervengan no sólo las variaciones anuales de estas señales sino también las relaciones que se establecen entre ellas, lo que de forma conjunta puede acabar modulando el ritmo anual de NPY.

En relación con las variaciones diarias de NPY, nuestro estudio es el primero en los peces que describe un ritmo diario significativo de NPY, concretamente en el contenido hipotalámico de los muestreos realizados en agosto y noviembre. En verano, la acrofase se alcanza en mitad de la fase luminosa, mientras que en otoño los valores máximos aparecen durante la escotofase. En la rata se han descrito ritmos en la expresión del mensajero del NPY en ciertos núcleos hipotalámicos, que son bimodales en el NSQ y en el ARC, pero unimodales en el NPV (Jhanwar-Uniyal y cols., 1990). Además, los momentos en que se alcanzan los valores máximos son variables, principio de la fotofase, principio de la escotofase, etc. Estas diferencias pueden deberse a que los animales estén sometidos a distintos ciclos luz/oscuridad, aunque hay también otros factores que pueden afectar a la expresión del ritmo diario, como el estado nutricional de los animales o la disponibilidad de alimento (Stricker-Krongrad y cols., 1997). Concretamente, una disponibilidad de alimento *ad libitum* parece ser necesaria para generar los patrones diarios de expresión no sólo del NPY, sino también de otros

péptidos orexigénicos hipotalámicos (GAL, POMC), cuya expresión génica es elevada durante la fase luminosa (Xu y cols., 1999). Esta propuesta justificaría la falta de ritmicidad del NPY en la tenca durante el invierno, cuando los peces no comen (Guijarro y cols., 1999).

En algunos estudios realizados en mamíferos se describen ritmos diarios de NPY con máximos antes de la alimentación y valores menores después de la ingesta (Akabayashi y cols., 1994). La tenca es un animal nocturno, que se alimenta principalmente durante la noche, con lo que el perfil del ritmo en agosto podría justificarse en base a esta relación con el horario de la alimentación; pero no explicaría el cambio de acrofase del ritmo de NPY observado en el otoño. En este sentido cabe cuestionarse si la tenca experimenta cambios en su patrón de alimentación y actividad (nocturno vs. diurno) al igual que ciertos peces, en los que las bajas temperaturas pueden producir inversiones de su patrón comportamental (Fraser y cols., 1995; Greenwood y Metcalfe, 1998; Madrid y cols., 2001). Según esta hipótesis, las tencas en verano se alimentan al comienzo de la escotofase (Vera y cols., 2004a) y mostrarían la acrofase del NPY unas 6 h antes del inicio de la alimentación. En noviembre, con una menor temperatura del agua, las tencas podrían pasar a alimentarse a por la mañana, aprovechando las horas más favorables del día en cuanto a temperatura se refiere, de forma que el momento de la alimentación vendría precedido por un incremento en los niveles de NPY que tendría lugar unas 6 h antes.

Otra posible explicación al cambio de fase del ritmo diario de NPY observado en la tenca podría ser un cambio de fase del ritmo de alimentación debido a las variaciones estacionales de la disponibilidad relativa de las diferentes presas que se da en condiciones naturales. Un ejemplo bien conocido de esta situación lo tenemos en la lubina, que puede alimentarse de una amplia variedad de presas y cuya composición dietaria varía estacionalmente, pudiendo invertir su ritmo de alimentación en función del momento del año (Picket y Pawson, 1994). Según Fraser y colaboradores (1993) los beneficios del cambio de actividad diaria son utilizados por numerosas especies de vida silvestre y están principalmente dirigidos a lograr una optimización de los cambios naturales en la densidad de presas y predadores.

Finalmente, cabe sugerir que la ausencia de ritmo diario de NPY en mayo y junio pueda estar relacionada con una posible pérdida del acoplamiento entre los ritmos de alimentación y la ritmicidad hipotalámica del NPY, que podría estar provocada por ejemplo por los esteroides gonadales o por la propia implicación del NPY en la regulación de la reproducción y el comportamiento sexual, o incluso por una alteración del patrón de

actividad general como consecuencia de la aparición de comportamientos de cortejo previos a la freza. No tenemos datos que apoyen esta hipótesis en los peces, pero por ejemplo en ratas se ha observado que los esteroides gonadales afectan al ritmo diario de  $\beta$ -endorfina, de modo que la ritmicidad de este péptido en el hipotálamo medio basal no está presente prepuberalmente y comienza a expresarse en la pubertad. El tratamiento con benzoato de estradiol hace que este ritmo aparezca antes de la pubertad y lo restaura en ratas adultas ovariectomizadas (Criscuolo y cols., 1994).

El hecho de que en el telencéfalo, a diferencia del hipotálamo de la tenca, no hayamos encontrado ritmicidad diaria de NPY en ninguna de las estaciones podría justificarse en base a la diferente funcionalidad de ambas regiones encefálicas; de modo que las funciones del NPY en el telencéfalo pueden no requerir variaciones diarias de este péptido por no estar relacionadas con el control de procesos cíclicos diarios. Las conexiones entre núcleos hipotalámicos que controlan el comportamiento alimentario con componentes del sistema circadiano justificarían la expresión del ritmo diario de NPY en el hipotálamo. Ya hemos comentado con anterioridad que el patrón diario de expresión del mensajero de NPY depende de la región encefálica, e incluso dentro de una misma región, de los núcleos concretos estudiados, pudiendo incluso no existir ritmicidad en determinados núcleos encefálicos (Shinohara y cols., 1993). Los únicos datos existentes relativos a peces indican que en *C. auratus* se produce un incremento en los niveles del mensajero de NPY en el telencéfalo-área preóptica 1-3 h antes del momento de la alimentación, descendiendo después durante las 3 h posteriores a la ingestión (Narnaware y cols., 2000), si bien en este estudio hay que tener en cuenta que los peces eran alimentados según un programa diario impuesto y no *ad libitum*, como fueron alimentadas las tencas en nuestro caso.

### 3.2. GHRELINA.

Los niveles plasmáticos de ghrelina encontrados en la tenca (80-120 pg/ml) son similares a los observados en el elefante marino (*Mirounga angustirostris*) (Ortiz y cols., 2003), pero inferiores a los descritos en *Lota lota* (350 y 760 pg/ml, Mustonen y cols., 2002a), entre 2 y 8 veces menores a los valores en humanos (Tschöp y cols., 2001a) y entre 1 y 3 órdenes de magnitud más bajos que los descritos en rata y ratón (Tschöp y cols., 2001b; Toshinai y cols., 2001), pudiendo estas diferencias de magnitud deberse a diferencias específicas.

Se han descrito cambios en los niveles circulantes de ghrelina relacionados con la edad y con el ciclo reproductor. En *Oreochromis niloticus*, Parhar y colaboradores (2003)

observan incrementos significativos en los niveles de expresión del ARNm de esta hormona en el estómago a lo largo del desarrollo, posiblemente relacionados con el crecimiento que se produce durante esta etapa del ciclo vital. Este incremento de la expresión de ghrelina dependiente de la edad se ha descrito también en la rata (Gualillo y cols., 2001; Sakata y cols., 2002; Hayashida y cols., 2002) y podría estar relacionado con el aumento de la secreción de GH, el desarrollo del tracto gastrointestinal y/o la estimulación de la ingesta. En nuestro estudio no hemos hallado diferencias entre machos y hembras en la ghrelina circulante en ninguno de los momentos del año en que se realizó el muestreo. Estos resultados coinciden con lo observado en el gadiforme *L. lota*, en el que no se observa dimorfismo sexual en los niveles circulantes de ghrelina ni antes, ni durante, ni después de la freza (Mustonen y cols., 2002a; Nieminen y cols., 2003). Esta ausencia de diferencias sexuales en la ghrelina circulante en peces también se ha descrito en la rata, donde la expresión del mensajero es muy similar en ambos sexos y no se modifica con los esteroides gonadales (Gualillo y cols., 2001). Sin embargo, en tilapia los niveles de expresión del ARNm son significativamente mayores en las hembras en todos los estados de desarrollo estudiados, incluyendo peces sexualmente maduros (Parhar y cols., 2003), lo que podría poner de manifiesto la existencia de diferencias específicas de especie en esta cuestión.

En la mayoría de los estudios realizados en los mamíferos, tanto las concentraciones plasmáticas de ghrelina, como los niveles de su mensajero en el estómago se encuentran elevados en condiciones de ayuno y alcanzan de nuevo los niveles normales tras la realimentación (Tschöp y cols., 2000; Bagnasco y cols., 2002; Muller y cols., 2002; Wang y cols., 2002a; Ortiz y cols., 2003). Según estos resultados, cabría esperar que en la tenca los niveles más elevados de ghrelina estuvieran asociados a las estaciones frías, cuando la ingesta se reduce drásticamente, llegando incluso a desaparecer. Sin embargo, los niveles más elevados de todo el año los encontramos en agosto, indicando que en la tenca no se da esta relación entre la ghrelina y el ayuno. Este resultado concuerda con la falta de correlación existente entre los niveles plasmáticos de ghrelina y el peso corporal o el peso de la grasa perivisceral en la tenca. El número de investigaciones realizadas en otros peces es muy reducido y los resultados son dispares. Así, en la tilapia (*Oreochromis niloticus*) se ha observado que la expresión de la ghrelina tampoco depende del estado nutricional en animales sexualmente maduros, dado que un ayuno de 7 días no modifica los niveles de expresión del ARNm (Parhar y cols., 2003). Tampoco en el sargo se ha encontrado una modificación de los niveles plasmáticos de ghrelina tras 2 semanas de ayuno (Vera y cols., 2004b). Por el contrario, en *L. lota* hay una menor concentración de ghrelina circulante en peces sometidos a 2 semanas de

ayuno respecto a los alimentados (Nieminen y cols., 2003). Por lo tanto, a partir de estas diferentes respuestas obtenidas en distintas especies, en la actualidad no podemos establecer una conclusión general respecto a la relación entre la ghrelina circulante y las condiciones de alimentación en los peces.

En roedores parece existir una correlación negativa entre el porcentaje de grasa corporal y la ghrelina plasmática (Tschöp y cols., 2001a), y de hecho la administración de ghrelina estimula la ingesta y reduce la utilización de grasa, lo que se traduce en una ganancia de peso (Tschöp y cols., 2000; Wren y cols., 2000; Nakazato y cols., 2001). Además, se ha descrito un aumento de los niveles plasmáticos de ghrelina en respuesta a la pérdida de peso (Kräup y cols., 2002). Esta correlación negativa en mamíferos nos lleva a plantear que el incremento observado de la ghrelina plasmática en la tenca en agosto, tras la freza, podría relacionarse con un periodo en el que se produce un gasto energético notable y una reducción en el peso corporal, además de una disminución muy importante de las reservas de lípidos (Guijarro y cols., 2003). El papel adaptativo de este incremento de la ghrelina plasmática tras el desove sería el de promover la ganancia de peso corporal y la recuperación de reservas energéticas mediante la estimulación de la ingesta (al menos en parte), puesto que un posible efecto orexigénico de la ghrelina ha sido demostrado recientemente en los peces (Unniappan y cols., 2002). Además, si la ghrelina es capaz de estimular la secreción de GH en la tenca, como ocurre en otros teleósteos (anguila, Kaiya y cols., 2003a y tilapia, Kaiya y cols., 2003b), los elevados niveles de esta hormona tras la freza podrían contribuir a estimular la gluconeogénesis, como se ha sugerido para la lota (Mustonen y cols., 2002a), que en esta época del año podría estar incrementada, como indican la elevada glucemia de la tenca en verano y otoño (Guijarro y cols., 2003). En los mamíferos la ghrelina regula la secreción de LH y testosterona (Furuta y cols., 2001; Tena-Sempere y cols., 2002), sin embargo en los peces no tenemos ningún dato que apoye una participación de la ghrelina en la reproducción.

Como hemos comentado antes, la composición de la dieta de la tenca puede variar en función de la época del año, debido a los cambios estacionales en la disponibilidad del alimento. Los niveles de ghrelina, al igual que discutimos para el NPY, pueden modificarse a lo largo del año en función de la composición de la dieta. Así, dietas ricas en grasas se correlacionan con niveles de ghrelina más bajos que las dietas ricas en carbohidratos (Beck y cols., 2002), mientras que las dietas bajas en proteínas se correlacionan con niveles elevados de esta hormona (Lee y cols., 2002). En peces no hay estudios al respecto, salvo un estudio reciente en sargo en el que los datos preliminares



parecen indicar que los niveles plasmáticos de ghrelina no se modifican en peces alimentados con una dieta carente de grasa (Vera y cols., 2004b). En nuestro estudio, la dieta comercial suministrada se mantuvo invariable durante todo el año, pero las tenca tenían acceso a presas naturales, aunque no podemos determinar el grado en que este factor contribuye al cambio anual en la composición de la dieta.

En la tenca encontramos una correlación negativa entre los niveles circulantes de ghrelina y el contenido hipotalámico de NPY en ambos sexos. Estos resultados discrepan de lo encontrado en mamíferos, en los que el tratamiento con ghrelina incrementa significativamente el contenido hipotalámico del ARNm de NPY (Kamegai y cols., 2001; Nakazato y cols., 2001; Wang y cols., 2002b) a través de la activación de neuronas del ARC (Guan y cols., 1997; Kamegai y cols., 2001) que expresan péptidos orexigénicos (Cowley y cols., 2003; Toshinai y cols., 2003). Aunque la ghrelina se sintetiza principalmente en el estómago (Kojima y cols., 1999; Muccioli y cols., 2002; Kaiya y cols., 2003a,b), se cree que la activación de neuronas productoras de péptidos orexigénicos se realiza por ghrelina sintetizada a nivel cerebral, por lo que no es necesaria una correlación positiva entre la ghrelina plasmática y el contenido hipotalámico de NPY. Pruebas a favor de la existencia de dos sistemas secretores de ghrelina independientes, al menos en parte, uno central y otro periférico, se han obtenido en experimentos en los que la vagotomía suprime el efecto orexigénico de la ghrelina (Asakawa y cols., 2001; Date y cols., 2002), pero no afecta a las acciones de esta hormona tras su administración intracerebroventricular (Date y cols., 2002). Recientemente se ha encontrado expresión de ghrelina en un grupo de neuronas adyacentes al tercer ventrículo entre los núcleos NPV y ARC hipotalámicos. Estas neuronas envían eferencias a circuitos hipotalámicos clave entre los que se encuentran núcleos productores de NPY, Ag-RP, POMC y CRH, donde la ghrelina estimula la actividad de neuronas NPYérgicas (Cowley y cols., 2003).

En nuestro estudio de ritmicidad diaria de ghrelina circulante en la tenca no hemos encontrado ritmos significativos en ninguno de los meses muestreados, salvo en junio, donde hay una variación de esta hormona a lo largo del ciclo día/noche con valores superiores durante la noche. Existen muy pocos estudios que investiguen posibles variaciones diarias de ghrelina en los vertebrados. En humanos la variación diaria de la secreción de ghrelina es sincronizada por la hora de la alimentación y por el sueño, de modo que, durante las horas del día, se observa un incremento preprandial en la ghrelina plasmática, seguido por una caída postprandial, mientras que por la noche se produce, a las 2:00 h, un único pico de mayor amplitud que los observados durante el día (Shiia y cols., 2002). En la rata se ha descrito un aumento brusco de la ghrelina plasmática y

estomacal durante el periodo de ayuno de la fase luminosa y niveles bajos durante la noche, correlacionándose inversamente con la ingesta (Sánchez y cols., 2004).

Por tanto parece claro que, a pesar de la limitada información disponible, la posible ritmicidad de ghrelina circulante se relaciona con la alimentación. En este sentido, los niveles plasmáticos de ghrelina experimentan un incremento transitorio justo antes de la ingestión de alimento (Cummings y cols., 2001, 2002; Sugino y cols., 2002a; Cummings y Shanon, 2003) y un descenso post-prandial (Cummings y cols., 2001, 2002) en modelos de alimentación restringida a una hora concreta, pero si los animales reciben alimentación *ad libitum*, los niveles circulantes de ghrelina no se modifican (Sugino y cols., 2002b). Precisamente en ratas mantenidas con alimentación *ad libitum* se han observado ritmos ultradianos de ghrelina relacionados con el ciclo sueño/vigilia (Bagnasco y cols., 2002; Tolle y cols., 2002).

En un estudio muy reciente en el carpín se han analizado cambios en la expresión génica de ghrelina en relación con la alimentación, siendo menor en condiciones postprandiales y más elevada tras 3-5 días de ayuno (Unniappan y cols., 2004). Además, la inyección ICV de ghrelina estimula la ingestión de alimento en esta misma especie (Unniappan y cols., 2002). Teniendo en cuenta que la tenca es un animal nocturno, los mayores niveles de ghrelina durante la noche en junio podrían estar relacionados con la alimentación nocturna. No obstante, ignoramos la explicación a la ausencia de oscilaciones diarias en los niveles circulantes de ghrelina en la tenca en el resto del año. Posiblemente el diseño empleado de alimentación *ad libitum* no favorezca la expresión de ritmos que estén sincronizados por un horario de alimentación.

### 3.3. LEPTINA.

La leptina es una hormona que en mamíferos actúa como señal lipostática informando sobre la adiposidad y regulando el apetito y el metabolismo para mantener constantes los depósitos de grasa, además de participar en la regulación de la función reproductora. En los últimos 10 años se han publicado numerosos trabajos sobre esta hormona (más de 6000), la mayoría de los cuales se han realizado en mamíferos, existiendo muy pocos estudios en vertebrados no mamíferos.

Las concentraciones plasmáticas de leptina en la tenca son similares a las halladas en *L. lota* (1,7-2,8 ng/ml) (Mustonen y cols., 2002a; Nieminen y cols., 2003), en la oveja (Asakuma y cols., 2003) y en el zorro ártico (Fuglei y cols., 2004), pero son menores a las publicadas para el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) (Cheng y cols., 2003), humanos (Rubin y cols., 2003), y la rata (Martínez-Merlos y cols., 2004). En la tenca no hemos

observado dimorfismo sexual en los niveles plasmáticos de leptina. Esto no coincide con lo descrito en la lota, donde las concentraciones plasmáticas de leptina son mayores en las hembras que en los machos (Mustonen y cols., 2002a; Nieminen y cols., 2003), como se ha observado también en humanos (Ma y cols., 1996; Saad y cols., 1997; Ahima y Osei, 2004). Sin embargo, en el visón (Nieminen y cols., 2000) y en la rata (Mulet y cols., 2003; Ahima y Osei, 2004) la situación está invertida, mostrando los machos mayores niveles de leptina plasmática que las hembras. En el caso de la lota, este dimorfismo no parece deberse a un mayor porcentaje de grasa corporal en las hembras, ya que no existe dimorfismo sexual en el peso del hígado (principal estructura almacenadora de lípidos en esta especie). En la tenca, por el contrario, si que existe dimorfismo sexual en el peso de este órgano (mayor en el caso de las hembras) pero no en el peso de la grasa perivisceral. Sin embargo, a pesar de no existir diferencias en el peso de la grasa perivisceral, si las hay en las correlaciones entre la leptina circulante y la adiposidad en los machos. Sin embargo, en las hembras existe una correlación negativa entre el peso del hígado y la leptina circulante, que no se da en los machos.

En la tenca, los niveles de leptina circulante se mantienen estables en verano, otoño e invierno (desde junio hasta febrero), experimentando un marcado descenso en primavera (mayo), periodo anterior a la freza en esta especie. En *L. lota* también se han descrito variaciones en los niveles circulantes de leptina en relación con el ciclo reproductor, con los valores más altos después de la freza (Mustonen y cols., 2002a). Si durante el invierno los animales experimentan una importante reducción de la ingesta, las hormonas que estimulan la ingesta y favorecen el incremento del peso corporal y la adiposidad (ghrelina y NPY) deberían estar elevadas en otoño, mientras que aquellas que favorecen la lipólisis y el gasto energético e inhiben la ingesta (leptina) deberían presentar niveles bajos, de manera que se favorezca la acumulación de reservas energéticas que puedan ser utilizadas como combustible metabólico durante el periodo de ayuno. Por el contrario, durante el periodo de ayuno debería producirse la situación inversa para favorecer la movilización de las reservas energéticas (Nieminen y cols., 2002). La fuerte caída de los niveles plasmáticos de leptina registrada en la tenca en mayo podría tener un importante significado adaptativo desde el punto de vista del metabolismo energético. La drástica reducción de la leptina plasmática en primavera facilitaría el inicio de la recuperación de las reservas energéticas, al desaparecer la posible inhibición de la ingesta. Además, este descenso podría deberse al ayuno experimentado por la tenca durante los meses fríos precedentes (el descenso de la temperatura del agua de 21 a 10°C produce una marcada disminución de la ingesta, hasta el punto de llegar casi a suprimirla, Guijarro y cols., 1999). Este efecto inhibitor del

ayuno se ha observado también en mamíferos (Kolaczynski y cols., 1996) y peces (Johnson y cols., 2000; Nieminen y cols., 2003). No obstante, en la tenca el perfil estacional de las hormonas reguladoras del peso corporal no se ajusta a esta hipótesis, probablemente debido a que además de este periodo de ayuno, la reproducción es una de las funciones que mayor coste energético conlleva. Si la leptina estimula la movilización de grasa en los peces como lo hace en los mamíferos (Reidy y Weber, 2000), los elevados niveles de leptina encontrados en la tenca en otoño e invierno podrían estar promoviendo la movilización de las reservas grasas para su utilización en aspectos relacionados con la reproducción, como la síntesis de esteroides sexuales o la vitelogénesis.

En los mamíferos la leptina se ha relacionado con la función reproductora (Ahima y cols., 1996; Barash y cols., 1996). En *P. sungorus* la reducción de la expresión del mensajero de la leptina es paralela a la atrofia gonadal (Klingenspor y cols., 1996). Por el contrario, en rata no se han hallado diferencias en los niveles séricos de leptina entre machos castrados, machos intactos y machos castrados con reemplazamiento de testosterona, lo que sugiere que la leptina no está regulada por las hormonas sexuales (Sohn y cols., 2002). En la tenca existe una correlación negativa entre el peso de la gónada y los niveles plasmáticos de leptina en hembras pero no en machos, contrario a lo encontrado en mamíferos. Además, en las hembras también hay una correlación negativa entre la leptina circulante y el peso del hígado, órgano clave en la reproducción en las hembras, dada su participación en la vitelogénesis. En la rata se ha demostrado que el estradiol puede estimular la producción de leptina *in vivo* (Shimizu y cols., 1997). Es posible que los elevados niveles de estradiol en el plasma de las hembras de lota incrementen las concentraciones circulantes de leptina (Mustonen y cols., 2002a). En machos de lota se ha encontrado una correlación negativa entre las concentraciones plasmáticas de leptina y los niveles de testosterona (Mustonen y cols., 2002a), que también ha sido descrita en humanos (Behre y cols., 1997) y en roedores (Wabitsch y cols., 1997). Sin embargo en la tenca, al menos en las hembras, no parece darse esta asociación entre esteroides gonadales y leptina, ya que en primavera y verano las hormonas sexuales presentan sus niveles máximos (Pinillos y cols., 2003), mientras que los niveles plasmáticos de leptina son mínimos en mayo.

Otro de los factores que en mamíferos afectan a la leptina es la exposición, tanto aguda (Puerta y cols., 2002) como crónica (Bing y cols., 1998), al frío. En ovejas se ha observado que la exposición crónica a bajas temperaturas (0°C durante al menos 1 semana) reduce los niveles plasmáticos de leptina (Asakuma y cols., 2003). En roedores,

las bajas temperaturas suprimen la expresión génica de leptina vía sistema nervioso simpático (Li y cols., 1997). Así, en la rata Bing y colaboradores (1998) observaron que la exposición prolongada al frío (4°C durante 21 días) induce una disminución en los niveles plasmáticos de leptina acompañada de una marcada pérdida de peso y un incremento en la ingesta. Este incremento en la ingesta no parece estar mediado por NPY ya que ni sus concentraciones hipotalámicas, ni la expresión de su mensajero en el hipotálamo se modifican. Sin embargo, en *P. sungorus* la expresión de leptina en el tejido adiposo no se modifica por cambios en la temperatura ambiental (Klingenspor y cols., 1996).

Durante periodos de ayuno los peces pueden regular a la baja su metabolismo y conservar sus sustratos entrando en una situación hipometabólica (Foster y Moon, 1991). En los meses fríos, por lo tanto, cabría esperar un descenso en los niveles circulantes de leptina. En la tenca, sin embargo, no hemos encontrado dicha reducción. No obstante, si como sugieren Koskela y colaboradores (1997), la ingesta y el peso corporal en peces expuestos a bajas temperaturas disminuyen inicialmente, pero aumentan tras varias semanas de exposición al frío, no debería esperarse una disminución de la leptina plasmática en los meses fríos. Esta ausencia de efecto de las bajas temperaturas sobre los niveles plasmáticos de leptina ha sido observada también en *L. lota* (Nieminen y cols., 2003).

En humanos y roedores de laboratorio, la leptina muestra una fuerte asociación positiva con la cantidad total de grasa corporal (Maffei y cols., 1995; Considine, 2001). Además, en algunos mamíferos hibernantes los niveles de leptina no siempre varían de forma paralela al peso corporal y la adiposidad, sino que en determinada época del año se produce un desacoplamiento entre sendos parámetros, de modo que los niveles plasmáticos de leptina no reflejan la adiposidad (*Myotis lucifugus*, Kronfeld-Schor y cols., 2000; *M. auratus*, Schneider y cols., 2000; *Sorex araneus*, Nieminen y Hyvärinen, 2000; *N. procyonoides*, Nieminen y cols., 2001, 2002; *Alopex lagopus*, Nieminen y cols., 2001). En la tenca hemos hallado una correlación positiva entre la leptina y el peso de la grasa perivisceral en los machos, pero no en las hembras. Johnson y colaboradores (2000) encontraron en dos especies de teleósteos (*L. macrochirus* y *P. annularis*) una correlación positiva entre el porcentaje de grasa corporal y las concentraciones cerebrales de leptina, pero no con la leptina plasmática. Por el contrario, mientras que en las hembras la leptina circulante se correlaciona negativamente con el peso corporal, hepático y gonadal, en los machos no se dan estas correlaciones. En *L. lota* los niveles plasmáticos de leptina aumentan después de la freza coincidiendo con una disminución del peso corporal y de la adiposidad del hígado (Mustonen y cols., 2002a,b). Es probable

que si en nuestro estudio las correlaciones entre leptina plasmática y peso corporal se hubiesen realizado en individuos correspondientes a cada punto de muestreo, y no considerando todos los datos del estudio anual, se hubiese podido establecer si en determinadas épocas del año ambos parámetros se correlacionan y si cambia el signo de esa correlación dependiendo de la estación. Este resultado en la tenca concuerda con los resultados del estudio de Vera y colaboradores (2004b) en el que tras someter a sargos picudos (*D. puntazzo*) a dos semanas de ayuno no encuentran modificaciones en los niveles plasmáticos de leptina, aunque los autores de este estudio no descartan que esta ausencia de modificaciones se deba a que el periodo de ayuno no fue lo suficientemente largo como para inducir cambios.

Las respuestas hipotalámicas y metabólicas a la leptina están reguladas principalmente por el fotoperiodo, más que por cambios estacionales en las reservas de grasa, esteroides sexuales o la propia concentración de leptina. Así, en *P. sungorus* se ha observado que la infusión crónica de leptina murina a dosis fisiológicas induce pérdida de peso y de grasa corporal en hámsters expuestos a fotoperiodos cortos, mientras que no tiene efecto en animales mantenidos en fotoperiodos largos (Atcha y cols., 2000). Este efecto no se acompaña de una reducción de la ingesta, sugiriendo una posible acción directa de la leptina en el balance energético (Rousseau y cols., 2002). La exposición a fotoperiodos cortos disminuye la expresión génica y la liberación de leptina en el tejido adiposo (Klingenspor y cols., 1996; 2000), lo que sugiere que esta hormona puede estar involucrada en las adaptaciones estacionales de los mamíferos mediadas por el fotoperiodo, independientemente de su estado nutricional. De hecho, en el hámster sirio se ha descrito un ritmo diario de los niveles plasmáticos de leptina inverso al de melatonina plasmática, lo que sugiere que el ritmo de leptina en esta especie depende de la pineal (y por tanto de la melatonina) y/o del fotoperiodo (Gündüz, 2002). En la rata se ha observado que la pinealectomía incrementa la liberación de leptina y que la administración de melatonina a ratas pinealectomizadas revierte este efecto. Además, la administración de melatonina disminuye los niveles plasmáticos de leptina tanto en ratas intactas como pinealectomizadas (Canpolat y cols., 2001).

La administración periférica crónica de leptina en ciertos peces (*O. kisutch*, Baker y cols., 2000; *L. cyanellus*, Londraville y Duvall, 2002) no parece afectar al peso corporal, lo que ha llevado a sugerir que en condiciones de metabolismo lento, como muestran en ciertas ocasiones los vertebrados ectotermos, la leptina podría actuar predominantemente como una señal de saciedad, en vez de como regulador de la homeostasis energética a largo plazo. Así, el tratamiento crónico con leptina en

*L. cyanellus* no modifica ninguno de los indicadores tradicionales de respuesta a la leptina en el organismo completo (modificaciones fenotípicas), como son el peso corporal, la ingesta, la grasa corporal, el peso hepático y cardíaco (Londrville y Duvall, 2002). A pesar de esta ausencia de efectos de la leptina sobre estos indicadores, los peces parecen responder a la leptina de acuerdo a las funciones que esta hormona ejerce en los mamíferos (modificaciones en los niveles de expresión de CART en *C. auratus*, Volkoff y Peter, 2001; regulación de la liberación de LH en *D. labrax*, Peyon y cols, 2001; incremento de la concentración de la proteína de unión a ácidos grasos en *L. cyanellus*, Londrville y Duvall, 2002). De modo que Londrville y Duvall (2002) sugieren que si la leptina es una defensa frente al ayuno más que una señal lipostática (Ahima y Flier, 2000) debe ejercer su acción más lentamente en los peces debido a que éstos pueden sobrevivir durante más tiempo que los mamíferos en condiciones de ayuno. Por lo tanto, y si esta hipótesis es cierta, para que los efectos globales de la administración de leptina (como cambios en la masa corporal), sean evidentes ésta debería realizarse durante varios meses. De hecho, una prueba a favor la tenemos en nuestro estudio con las correlaciones entre los niveles plasmáticos de leptina y los pesos corporal y de la grasa perivisceral.

Las concentraciones plasmáticas de leptina pueden variar dependiendo de la composición de la dieta. En ratas alimentadas durante 5 meses con una dieta rica en grasa se produce un incremento del 189% en la leptinemia, acompañado de un incremento del 48% en la adiposidad respecto a ratas alimentadas con una dieta baja en grasa (Stricker-Krongrad y cols., 1998). Además, en ratas que muestran de forma espontánea preferencia por las dietas con un elevado contenido en grasa se ha descrito un incremento de más del 50% en los niveles circulantes de leptina respecto a las ratas que muestran preferencia por la dieta rica en carbohidratos (Beck y cols., 2001). Como se discutió anteriormente para el NPY y la ghrelina, las variaciones observadas en los niveles plasmáticos de leptina en la tenca podrían deberse, al menos en parte, a un cambio cualitativo en su dieta a lo largo del año. Sin embargo, como sucede con los dos péptidos orexigénicos estudiados, esta hipótesis contradice los resultados del estudio de Vera y colaboradores (2004b), en el que los cambios en la composición de la dieta no inducen modificaciones en los niveles circulantes de leptina en el sargo picudo.

Nieminen y colaboradores (2002) sugieren que las variaciones estacionales de los niveles plasmáticos de leptina en el perro mapache podrían estar determinadas por un reloj endógeno sincronizado por un "zeitgeber" exógeno. Klingenspor y colaboradores (1996) han sugerido que la leptina podría estar implicada en las adaptaciones

estacionales mediadas por el fotoperiodo independientemente del ayuno o la sobrealimentación en mamíferos. Estos autores han observado una marcada reducción de la expresión del ARNm de la leptina en la grasa blanca de *P. sungorus* durante el invierno y un incremento en verano, independientemente de los cambios en la temperatura ambiental. Este patrón estacional es paralelo a los cambios en el peso corporal (que se deben a cambios en la cantidad de grasa) y en el fotoperiodo. Mercer y colaboradores (2000) encontraron en esta misma especie una disminución de la expresión génica del receptor de leptina en el ARC y de la proteína en el tejido adiposo, así como de los niveles circulantes de leptina como consecuencia de la exposición a fotoperiodos cortos.

Una de las principales funciones de la reducción drástica en los niveles plasmáticos de leptina parece ser la desinhibición de la producción de NPY, activándose los mecanismos neuroendocrinos de respuesta al ayuno (Ahima y cols., 1996). En la tenca, sin embargo, no hemos hallado una correlación entre el contenido hipotalámico ni telencefálico de NPY con los niveles circulantes de leptina, lo que podría estar sugiriendo que en esta especie las acciones de ambos reguladores son independientes. Estos resultados no están de acuerdo con la reducción de la expresión del mensajero de NPY en el cerebro de *C. auratus*, concretamente en el telencéfalo-área preóptica y en el hipotálamo, causada por la administración central de leptina murina (Volkoff y cols., 2003). Además, estos autores sugieren que el NPY incrementa la capacidad de respuesta frente a la leptina, probablemente a través de una regulación al alza de los receptores para esta hormona. Además, la administración central de esta hormona atenúa el efecto estimulador de la ingesta inducido tanto por NPY como por orexina-A y reduce la expresión del ARNm del NPY a nivel hipotalámico.

La leptina podría también regular la ingesta a través de la modulación de la producción de ghrelina, ya que estudios recientes han puesto de manifiesto que el incremento en la expresión hipotalámica de leptina suprime el aumento del apetito inducido por ghrelina, y que la leptina periférica disminuye la secreción de ghrelina por el estómago (Kalra y cols., 2003). A su vez, las acciones de la leptina son antagonizadas por la ghrelina (Shintani y cols., 2001). En nuestro estudio, sin embargo, hemos encontrado una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de leptina y ghrelina en tencas machos, que no confirmaría esta hipótesis para la tenca.

En humanos se han descrito ritmos diarios de los niveles plasmáticos de leptina, con un máximo poco después de la media noche y valores mínimos alrededor del mediodía (Laughlin y Yen., 1997; Saad y cols., 1998; Kanabrocki y cols., 2001; Kalra y



cols., 2003), pudiendo estar este incremento nocturno relacionado con la supresión del apetito durante las horas de sueño (Shina y cols., 1996). No se trata de un verdadero ritmo circadiano, sino que depende del patrón de alimentación, ya que cambios en el horario de alimentación, sin modificar los patrones de sueño, modifican el ritmo de leptina (Schoeller y cols., 1997). En rata se ha demostrado que la expresión del mensajero de leptina en el tejido adiposo también es rítmica, y que esta ritmicidad está estrechamente asociada a la ingesta (Saladin y cols., 1995). En esta misma especie también existe un patrón diario en la expresión del mensajero de leptina en los adipocitos, con valores reducidos durante la fase luminosa y elevados durante la fase oscura (Xu y cols., 1999). En este mismo estudio la expresión del receptor de leptina también muestra un perfil diario, aumentando abruptamente al comenzar el comportamiento alimentario y disminuyendo progresivamente durante la fase oscura. El ritmo de la leptina plasmática es diferente al de la expresión adipocítica de su mensajero, aumentando 4 h después del inicio del comportamiento alimentario (Xu y cols., 1999). Este ritmo diario de leptina plasmática está encarrilado por el momento de la alimentación, de modo que cuando se restringe el acceso al alimento a 2 h durante la fase luminosa, se produce un cambio de fase, registrándose el valor máximo después de la ingestión de alimento, persistiendo este ritmo durante dos ciclos en condiciones de ayuno (Martínez-Merlos y cols., 2004). Sin embargo, cuando tras un periodo de restricción del horario de alimentación se permite el acceso al alimento *ad libitum*, el ritmo de leptina en condiciones de ayuno pasa a estar sincronizado por la alternancia luz/oscuridad. En la tenca, que como la rata es un animal de hábitos nocturnos y que en nuestro estudio dispone de alimento a lo largo de 24 h, cabría esperar la aparición de un valor máximo de leptina durante la noche, asociado al comportamiento alimentario. Sin embargo, no hemos encontrado un ritmo diario significativo en ninguno de los puntos de muestreo. No existe ningún estudio previo en peces que investigue posibles ritmos diarios de esta hormona. Esta ausencia de ritmo diario se ha encontrado también en el hámster siberiano (Drazen y cols., 2000) y en los niveles plasmáticos de leptina en ratas lactantes y no lactantes (Asakuma y cols., 2004), si bien, los niveles de leptina en el líquido cefalorraquídeo son menores durante la fase oscura que durante la fase luminosa del fotociclo diario, lo que llevó a estos autores a sugerir que es la leptina del líquido cefalorraquídeo, más que la presente en la circulación periférica, la que afecta a los patrones de alimentación diarios.

### 3.4. MONOAMINAS.

El contenido hipotalámico de monoaminas en el presente estudio en tencas adultas es de un orden de magnitud similar al descrito en alevines de tenca (De Pedro y cols., 1998b; 2003) y en carpín dorado (De Pedro y cols., 2001a), y al descrito por otros autores que utilizaron el mismo método de determinación (HPLC con detección electroquímica) (Sloley y cols., 1986, 1992; Winberg y cols., 1997; Øverli y cols., 1999), aunque para hacer este análisis comparativo es necesario tener en cuenta factores como la especie, la edad y el tamaño del pez, el estado nutricional, las regiones encefálicas estudiadas, la estación del año y el momento del ciclo diario en que se realizan los muestreos.

La determinación del contenido hipotalámico de monoaminas proporciona una información limitada acerca de su actividad biológica, de forma que una disminución en la concentración de una determinada monoamina puede interpretarse bien como una mayor utilización del neurotransmisor o bien como una reducción en su síntesis. Sin embargo, una forma útil de discriminar entre estas dos opciones es mediante el análisis conjunto de la monoamina y su metabolito, concretamente con el cociente entre el metabolito de degradación y la monoamina, que estima el índice de recambio o de utilización del neurotransmisor. De este modo, numerosos estudios utilizan los cocientes HMPG/NA, DOPAC/DA y 5-HIAA/5-HT como índices de las actividades noradrenérgica, dopaminérgica y serotoninérgica, respectivamente (Winberg y Nilsson, 1993).

El contenido hipotalámico de NA sigue un patrón estacional similar en ambos sexos, y paralelo al mostrado por la ghrelina plasmática, con valores bajos en noviembre y febrero y más elevados en mayo y agosto. Esto estaría de acuerdo con el papel orexigénico de ambos reguladores en los vertebrados (Capuano y cols., 1992; Wellman y cols., 1993; Broglio y cols., 2003; Horvath y cols., 2003). Como se discutió en el caso de la ghrelina, el elevado contenido hipotalámico de NA tras el desove contribuiría a la recuperación de las reservas energéticas, probablemente mediante la estimulación que esta catecolamina ejerce sobre la ingesta, como se ha demostrado previamente en *C. auratus* (De Pedro y cols., 1998a). Sin embargo, tampoco en el caso de la NA se ha encontrado una relación entre el ayuno invernal y esta amina en la tenca, coincidiendo con una falta de correlación en el presente estudio entre el peso corporal y la NA hipotalámica.

En nuestro estudio, el contenido hipotalámico de DA muestra variaciones significativas a lo largo del año, siendo en invierno menor que en verano con los niveles más altos en agosto, patrón idéntico al seguido por el índice de recambio dopaminérgico.

Esta baja actividad dopaminérgica en primavera, después de un periodo de ayuno prolongado podría tener como objetivo reducir al máximo una de las señales anoréticas del organismo, permitiendo así, gracias a un incremento importante de la ingesta, la recuperación de las reservas energéticas. Estos resultados están de acuerdo con el papel inhibidor de la ingesta descrito para la DA tanto en mamíferos (Bednar y cols., 1995; Bernardis y Bellinger, 1996; Yang y cols., 1997), como en peces (De Pedro y cols., 1998a); así como con la reducción observada en dicha catecolamina tras un ayuno de 7 días en *C. auratus* (De Pedro y cols., 2001a). Sin embargo, no coinciden con un estudio previo en la tenca, en el que una semana de ayuno incrementa el contenido hipotalámico de DA y NA (De Pedro y cols., 2003), aunque estos autores sugieren que este incremento podría deberse más a la situación de estrés generada que a la propia falta de alimento, dado el carácter fácilmente estresable de las tencas. En el presente estudio esta hipotética situación de estrés no se produce, dado que el ayuno observado en invierno en condiciones naturales no es un ayuno impuesto, sino más bien un mecanismo de adaptación utilizado por las tencas a las bajas temperaturas de invierno.

De forma paralela, el mayor contenido de DA en el hipotálamo de las tencas del presente estudio en verano, época del año en que tiene lugar una importante actividad alimentaria coincide con un estudio previo en esta misma especie, en el que se describe un incremento en el contenido hipotalámico de DA con la alimentación (De Pedro y cols., 1998b). En los mamíferos se ha observado que la alimentación también estimula la síntesis (Fernstrom y Fernstrom, 1994) y liberación (Yang y cols., 1996; Hajnal y Lénárd, 1997; Westerink y cols., 1997) de DA. Por ejemplo, en la rata la ingesta de proteínas estimula la síntesis y liberación de DA en neuronas encefálicas, probablemente hipotalámicas, a través de la modificación de la disponibilidad de tirosina (aminoácido precursor de la DA) en el SNC (Fernstrom y Fernstrom, 1994). Esta relación entre ingesta, disponibilidad del precursor y catecolaminas ha sido propuesta también para los peces por Spieler (1992). En cuanto al contenido de DOPAC, los datos de que se disponen son contradictorios, ya que mientras que en unos casos el DOPAC, y por lo tanto la tasa de recambio, aumenta con la alimentación (Thibault, 1992; Westerink y cols., 1994), en otros se incrementa en situaciones de ayuno (Page y cols., 1993) o de reducción de la ingesta (Orosco y Nicolaidis, 1994). En *C. auratus* el ayuno no modifica el metabolismo de la DA, pero reduce su contenido hipotalámico (De Pedro y cols., 2001a), lo que sugiere que esta reducción podría deberse más a una disminución de su síntesis que a un aumento de su utilización; mientras que en el presente estudio encontramos una reducción tanto de la DA como de su metabolito, pudiendo deberse estas diferencias a la distinta duración del periodo de ayuno.

En la tenca, al igual que se ha sugerido para otros teleósteos, el contenido hipotalámico de monoaminas muy probablemente esté modulado, además de por la alimentación, por los esteroides sexuales. Numerosos estudios han descrito, en diferentes especies de teleósteos, variaciones en el contenido encefálico de monoaminas relacionadas con el ciclo reproductor (Saligaut y cols., 1999; Trudeau y cols., 1993a; Senthilkumaran y Joy, 1995, 1996; Joy y cols., 1998; Hernández-Rauda y Aldegunde, 2002). Sin embargo, los datos disponibles revelan que no existe un patrón común en todas las especies, sino que las modificaciones de los sistemas monoaminérgicos a lo largo del ciclo reproductor son muy variadas (Khan y Joy, 1988a; Guerrero y cols., 1990; Manickam y Joy, 1990; Senthilkumaran y Joy, 1995). En la tenca la tasa de recambio de DA es máxima en agosto, después de la freza, y va disminuyendo a lo largo del año hasta alcanzar los niveles mínimos en febrero y mayo. La baja actividad dopaminérgica observada en mayo en nuestro estudio concuerda con el efecto inhibitorio de la DA sobre la liberación, basal o inducida por GnRH, de GTH II observado en distintas especies de teleósteos (Trudeau y Peter, 1995; Senthilkumaran y Joy, 1996), de forma que esta baja actividad del sistema dopaminérgico durante la primavera favorecería la liberación de las gonadotropinas necesarias para iniciar el desove. Estos resultados también están de acuerdo con estudios previos en hembras de trucha arcoiris y carpín dorado, en los que la actividad dopaminérgica, tanto en el hipotálamo como en el telencéfalo, disminuye con la recrudescencia gonadal (Saligaut y cols., 1999; Trudeau y cols., 1993b). También en *Heteropneustes fossilis* parece requerirse una reducción del tono inhibitorio dopaminérgico que permita la freza, ya que tanto los niveles de DA como su tasa de recambio están elevados durante la fase de reposo del ciclo reproductor y disminuyen durante el desarrollo gonadal hasta alcanzar los niveles mínimos durante la freza (Senthilkumaran y Joy, 1995). Una situación algo diferente se ha descrito en machos de pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*), especie que tiene un periodo prolongado de freza que se extiende desde septiembre hasta febrero y el resto del año incluye un periodo de reposo gonadal, seguido del estado preparatorio de la freza. En esta especie el DOPAC y el cociente DOPAC/DA en el hipotálamo aumentan con el desarrollo gonadal (Hernández-Rauda y Aldegunde, 2002).

Uno de los mecanismos propuestos para la acción de los esteroides gonadales sobre los sistemas monoaminérgicos encefálicos implicaría la activación de las enzimas de la ruta biosintética, DA $\beta$ OH y la PNMT (Senthilkumaran y Joy, 1996). Además, se han descrito fibras dopaminérgicas que inervan el área preóptica y que pueden contribuir a la modulación de la actividad de las neuronas productoras de GnRH (Goos y cols., 1985). Esta modulación, aunque en general es de tipo inhibitorio, varía considerablemente su

potencia entre especies, pudiendo ser fuerte, moderada o incluso inexistente (Peter y cols., 1991; Yaron, 1995). Por otro lado, los cambios en la actividad noradrenérgica a lo largo del ciclo reproductor podrían estar relacionados con el control de la secreción de GTH II (Hernández-Rauda y Aldegunde, 2002), dado que la NA facilita la liberación de GTH II (Trudeau y Peter, 1995; Senthilkumaran y Joy, 1996).

En la tenca el contenido hipotalámico de A sigue un perfil anual con los valores más elevados en invierno en ambos sexos. En estudios previos realizados en carpín (De Pedro y cols., 2001b) y en alevines de tenca (De Pedro y cols., 2003) no se han podido relacionar los niveles hipotalámicos de esta monoamina con el control de la alimentación, por lo que en principio cabe esperar que las diferencias anuales observadas en el presente estudio no dependan de los cambios estacionales de la alimentación ya que ni en el carpín ni en alevines de tenca el ayuno modifica el contenido hipotalámico de esta monoamina. Estos resultados podrían indicar que esta catecolamina no desempeña un papel clave en la regulación de la alimentación, al menos en estas especies. Desconocemos, por el momento, el significado biológico del ciclo anual de la adrenalina en la tenca, aunque hay que tener en cuenta que podría venir determinado por factores tanto endógenos como ambientales (luz, temperatura), que requerirían un estudio más detallado para poder determinar su posible implicación en la modulación de este ritmo.

En las tencas adultas las concentraciones de 5-HT son máximas en las estaciones cálidas y mínimas en las estaciones frías. En ambos sexos, el contenido de 5-HIAA aumenta desde valores mínimos en primavera, para alcanzar el máximo en verano y disminuir manteniéndose estable durante otoño e invierno. Estas modificaciones en la 5-HT y su metabolito dan lugar a un patrón anual de actividad serotoninérgica idéntico en ambos sexos, con los valores más elevados en verano y los más bajos en primavera. Distintas aproximaciones comportamentales y farmacológicas que producen un incremento de la transmisión serotoninérgica en el SNC inducen saciedad en diferentes especies de mamíferos (Meguid y cols., 2000; Costentin, 2003; Heisler y cols., 2003). Además, se ha demostrado que la 5-HT está involucrada en la regulación de la alimentación en vertebrados, de hecho, la administración central de 5-HT ejerce un efecto inhibitorio sobre la ingesta, tanto en mamíferos (Dagnault y cols., 1993; Gibson y cols., 1993) como en peces (De Pedro y cols., 1998c). Sin embargo, no se han encontrado modificaciones en el sistema serotoninérgico en respuesta a la cantidad de alimento en mamíferos, donde el ayuno no modifica el contenido hipotalámico de 5-HT ni de su metabolito (Hunsicker y cols., 1992). En el carpín ni el ayuno ni la realimentación modifican los niveles hipotalámicos de 5-HT (De Pedro y cols., 1998c). En *Coregonus*

*lavaretus* la restricción del alimento (media o alta) tampoco parece afectar a las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en distintas áreas cerebrales (telencéfalo, hipotálamo y tallo cerebral), aunque sí modifica el índice de recambio de esta indolamina, siendo mayor en el grupo expuesto a una restricción alta (Jobling y cols., 1999). Este fenómeno podría explicar en parte los resultados de nuestro estudio ya que, en invierno, durante la época de ayuno, la actividad serotoninérgica es elevada respecto a otoño y mayo, mientras que en primavera, cuando se reinicia la alimentación es baja. Sin embargo, esta hipótesis no justificaría la elevada tasa de recambio observada en agosto, que podría estar relacionada con otros factores como las interacciones sociales. En este sentido se ha descrito que la actividad de los sistemas monoaminérgicos está altamente influenciada por las interacciones sociales y la jerarquía que se establece entre individuos, tanto en el comportamiento alimentario como sexual. Por ejemplo, en *Salvelinus alpinus*, un bajo estatus social se correlaciona con una elevada actividad serotoninérgica (Winberg y Nilsson, 1993), como indican los elevados niveles encefálicos de 5-HIAA. También en *Haplochromis burtoni* se han hallado diferencias entre machos no territoriales y los que sí lo son, siendo tanto la relación 5-HIAA/5-HT como el contenido de 5-HIAA superiores en los primeros (Winberg y cols., 1997). Por otra parte también se ha observado que el estrés produce un aumento de la actividad serotoninérgica en el encéfalo de los teleósteos (Winberg y Nilsson, 1993; Winberg y cols., 1993a; Winberg y cols., 1993b; Øverli y cols., 1999). En este sentido, cabría pensar en las elevadas temperaturas del verano como factor de estrés para las tencas, justificando el alto contenido de 5-HT, así como la elevada actividad serotoninérgica observada en esta estación.

La posible relación del ciclo anual de serotonina con el ciclo reproductor en los teleósteos depende de la especie. Hernández-Rauda y Aldegunde (2002) no hallaron modificaciones en la 5-HT hipotalámica ni hipofisaria, ni en los niveles hipotalámicos de 5-HIAA a lo largo del ciclo reproductor de machos de pargo amarillo, pero sí en el contenido telencefálico, disminuyendo tanto el contenido como la actividad serotoninérgica entre los periodos de pre-freza y freza. Sin embargo, el contenido hipotalámico de 5-HT varía significativamente a lo largo del ciclo reproductor en *Channa punctatus*; los niveles máximos se alcanzan, como en la tenca, después de la freza (noviembre) y van disminuyendo durante el periodo preparatorio (febrero) y el periodo pre-freza (mayo) (Khan y Joy, 1988a). En este mismo estudio se muestra un patrón estacional invertido para la actividad MAO, que va aumentando desde noviembre hasta mayo. Pruebas a favor de esta regulación fisiológica de las gonadotropinas por la propia 5-HT se ha obtenido en *Micropogonias undulatus* (Khan y Thomas, 1993), *C. auratus* (Trudeau, 1997) y *Solea senegalensis* (Rodríguez-Gómez y cols., 2000).

En nuestro estudio no hemos encontrado variaciones diarias en el contenido hipotalámico de ninguna de las monoaminas estudiadas (NA, DA, A y 5-HT). Estos datos coinciden con los descritos para distintas regiones encefálicas del pollo, entre las que se encuentra el hipotálamo, en las que no hay variaciones día/noche en los niveles de ninguna de las monoaminas (Siuciak y cols., 1992). Sin embargo, discrepan de lo descrito tanto en mamíferos (Ozaki y cols., 1993; Arutiunian y cols., 2001), como en teleósteos (Khan y Joy, 1987, 1988a,b; Hernández-Rauda y Aldegunde, 2002). Datos previos de nuestro grupo de investigación muestran en alevines de tenca la existencia de variaciones diarias en el contenido hipotalámico de A, DA y NA, con la acrofase durante la fase luminosa del ciclo luz/oscuridad, concretamente 4 h después de la ingestión de alimento (De Pedro y cols., 1998b), por lo que se sugiere que estos ritmos podrían venir determinados por el horario de alimentación. La discrepancia entre ambos trabajos puede explicarse en base a diferencias en el diseño experimental. En primer lugar, los peces utilizados en el presente estudio son adultos sexualmente maduros frente a los alevines utilizados en el trabajo anterior (De Pedro y cols., 1998b). Esta diferencia de edad puede tener gran importancia, ya que como se señaló anteriormente existe una relación entre los esteroides sexuales y el metabolismo de las catecolaminas (Saligaut y cols., 1990, 1993), y además, la acción de los esteroides gonadales sobre el metabolismo catecolaminérgico parece depender del momento del ciclo reproductor (Manickam y Joy, 1990; Senthilkumaran y Joy, 1995). Otra posibilidad que no podemos descartar es el diferente patrón de alimentación en ambos estudios, ya que en el presente trabajo el alimento está disponible *ad libitum* a lo largo de todo el día y los peces se muestrean tras 24 h de ayuno, mientras que en el estudio de De Pedro y colaboradores (1998b) la disponibilidad de alimento se restringe a unas horas al día, durante la fase luminosa del fotociclo diario.

La expresión de los ritmos diarios de monoaminas parece depender del momento del ciclo reproductor en que se estudien. Así, en *Channa punctatus* se han descrito variaciones diarias en el contenido hipotalámico de 5-HT y en la actividad MAO en la fase preparatoria (febrero) del ciclo reproductor, con los niveles máximos en la mitad de la fotofase y en la mitad de la escotofase respectivamente, mientras que este ritmo desaparece en el periodo pre-freza (mayo) y post-freza (noviembre) (Khan y Joy, 1988b). Por otro lado, no podemos descartar que los ritmos estén presentes en tencas individuales, pero con distintas fases, lo que condicionaría una pérdida de la posible ritmicidad al realizar la media de los valores individuales. Finalmente, otra posible explicación a la ausencia de ritmo en el presente trabajo es que, aunque los ritmos de los distintos peces estén en fase, existan diferencias de amplitud entre ellos, y al aplicar los

valores medios se produzca un efecto de amortiguación de los mismos. Estas posibles diferencias en fases y amplitudes de ritmos entre individuos se evitan en estudios de ritmicidad en los que se utiliza el mismo individuo, pero es una limitación insalvable cuando se utilizan distintos animales porque es necesario sacrificar los peces para obtener los valores que conforman el perfil rítmico.

Hemos encontrado oscilaciones diarias en el contenido de HMPG y de DOPAC en agosto, siendo el ritmo de ambos metabolitos inverso. Estos ritmos diarios en los metabolitos de NA y DA se traducen en ritmos diarios en el cociente metabolito/catecolamina en agosto, y ponen de manifiesto una actividad noradrenérgica disminuida y una actividad dopaminérgica incrementada durante la escotofase. Esta relación aparentemente antagónica entre la actividad noradrenérgica y dopaminérgica está en concordancia con el papel que ambas catecolaminas ejercen sobre la ingesta en teleósteos, la NA la estimula a través de receptores  $\alpha_1$  (De Pedro y cols., 1995a; 1998a) y la DA la inhibe (De Pedro y cols., 1998a,b). Si los ritmos asociados a la alimentación persistieran tras 1 día de ayuno, es razonable que la actividad noradrenérgica se incremente antes del momento de la ingesta produciendo una señal estimuladora del apetito, y que concomitantemente se produzca la reducción de la señal inhibitoria gracias a la disminución de la actividad dopaminérgica.

En invierno, además, hemos encontrado un ritmo diario de actividad serotoninérgica con los valores máximos del cociente 5-HIAA/5-HT en el primer tercio de la fase luminosa en concordancia con los datos encontrados en el pollo (Siuciak y cols., 1992). Este ritmo no está asociado a la alimentación, dado que en esta estación los peces no se alimentan, pero podría estar asociado a cambios en el fotoperiodo y a la regulación de otros ritmos, dado que numerosos estudios realizados en mamíferos han puesto de manifiesto una relación mutua entre la 5-HT cerebral y el ciclo luz-oscuridad ambiental, según la cual la luz modula el ritmo de la indolamina y ésta modula las respuestas de los ritmos circadianos a la luz (Ozaki y cols., 1993). Además, la intensidad de la luz es importante en la modulación del ritmo de serotonina en el rafe, ya que dependiendo de ésta la acrofase varía (Cagampang y cols., 1993). Parece ser que el incremento en el contenido de 5-HT se relaciona más con la transición oscuridad-luz que con la luz *per se*, lo que podría explicar el posible papel de la 5-HT en la sincronización a los ciclos luz-oscuridad.

Finalmente, hay que añadir que, a pesar de que en mamíferos se han realizado varios estudios que muestran la existencia de ritmos diarios en las monoaminas (Wesemann y cols., 1989; Ferraro y Steger, 1990; Cagampang y cols., 1993; Ozaki y cols., 1993), la comparación con nuestros resultados es compleja ya que en nuestro caso



la determinación de los niveles de monoaminas se realizó en un área encefálica grande, como es el hipotálamo, mientras que en mamíferos estos estudios se llevan a cabo, generalmente, en núcleos concretos o bien en el líquido cefalorraquídeo, donde los datos obtenidos representan sólo la cantidad de monoaminas liberada, mientras que en nuestro caso los resultados obtenidos reflejan la cantidad de monoaminas sintetizada, almacenada y liberada.

#### **4. CONTENIDO DE MELATONINA Y ACTIVIDAD AA-NAT EN EL TEJIDO OCULAR DE *Tinca tinca*.**

##### **4.1. VARIACIONES DIARIAS Y ESTACIONALES. PAPEL DE LA TEMPERATURA.**

En el presente estudio se describe por primera vez la existencia de ritmos de melatonina y actividad AA-NAT en la retina de la tenca. Ambos parámetros muestran una ritmicidad diaria en primavera y verano, con valores nocturnos significativamente más elevados que los diurnos. La concentración de MEL ocular en la tenca es de un orden de magnitud similar a la medida por ELISA en las retinas de *D. labrax* (García-Allegue y cols., 2001), pero superior a la descrita en *E. lucius* (Falcón y Collin, 1989) y en *Salvelinus fontinalis* (Zachmann y cols., 1992b). Existen otros estudios publicados sobre producción de MEL en la retina de peces, pero utilizando sistemas de cultivos, estáticos o en superfusión, y en los que se analiza la liberación de la indolamina al medio de cultivo (Cahill, 1996). En la tenca existe un único estudio previo en el que se determinan por enzimoimmuno ensayo niveles de melatonina circulante en el mes de septiembre a medio día y a media noche, encontrando valores de 15 y 87 pg/ml, respectivamente (Rebollar y cols., 1999).

El ritmo diario, tanto de actividad AA-NAT como de MEL ocular en la tenca muestra el perfil clásico, es decir, niveles máximos de MEL durante la escotofase y mínimos en la fase luminosa del fotociclo diario. Sin embargo, en algunos teleósteos se ha descrito algo inusual en los vertebrados, ritmos inversos con concentraciones oculares diurnas mayores que las nocturnas, como así sucede en *O. mykiss* (Gern y cols., 1978), *S. fontinalis* (Zachmann y cols., 1992b) y *D. labrax* (Sanchez-Vázquez y cols., 1997; Iigo y cols., 1997c; Bayarri y cols., 2003). En la actualidad se ignora la explicación a esta diferencia crucial en la síntesis de MEL ocular y pineal, aunque algunos estudios plantean que podría justificarse en base a una distinta funcionalidad de la MEL de origen pineal y de origen ocular. La melatonina producida por la retina podría ser utilizada por el pez como una señal paracrina, transductora de la fase luminosa en estas especies, mientras que la melatonina plasmática (que muestra un clásico perfil nocturno) actuaría como una

señal de oscuridad, al igual que en el resto de las especies. A favor de esta posibilidad se ha demostrado la existencia de dos isoenzimas de la AA-NAT, una presente en el órgano pineal y otra encargada de la síntesis de melatonina en el ojo, en dos especies de teleósteos, el lucio (Coon y cols., 1999) y la trucha arcoiris (Benyassi y cols., 2000; Mizusawa y cols., 2000). Se trata de proteínas distintas codificadas por genes distintos (Coon y cols., 1999; Shi y cols., 2004), con una expresión diferencial en pineal y retina (la AA-NAT1 se expresa principalmente en la retina y la AA-NAT2 en la pineal), y mediante técnicas de RT-PCR se ha demostrado que la AA-NAT1 de la retina no está regulada por un reloj circadiano (Mizusawa y cols., 2000). Sin embargo, en otros teleósteos, como el pez cebra, sólo se ha encontrado una AA-NAT (Bégay y cols., 1998). Según Falcón y colaboradores (2003), la presencia de distintas AA-NATs y quizá también de otras proteínas implicadas en la fototransducción, tendría claras ventajas para el desarrollo de las funciones paracrinas de la melatonina en la retina. Por lo que aún permanece abierta la interesante, aunque excepcional, cuestión de una ritmicidad de MEL invertida en ciertas especies de teleósteos.

La producción rítmica diaria de MEL en la tenca muestra en condiciones naturales una marcada variación estacional. La ritmicidad significativa que se observa en primavera y verano (tanto para la actividad AA-NAT como para la MEL producida) se pierde durante las estaciones de otoño e invierno. Un estudio estacional completo, como el presentado en esta Memoria no se ha realizado con anterioridad para la MEL ocular en peces, aunque sí en otros ectotermos, como *Rana perezi*, donde el contenido ocular y también los niveles circulantes de MEL muestran una evolución estacional muy similar a la encontrada en la tenca (Delgado y Vivien-Roels, 1989; Delgado y cols., 1993). En esta especie existe un ritmo diario significativo también en otoño, sin embargo en la tenca, a pesar de que los valores de actividad AA-NAT a mitad de la noche son significativamente superiores que la media de los valores diurnos en otoño, el ritmo no es significativo. Esta diferencia podría deberse a las distintas fechas de muestreo en ambos estudios y las diferentes condiciones ambientales existentes, de hecho el año en que se realizó el muestreo en la tenca el otoño fue muy frío, particularmente durante los días precedentes a la toma de muestras (véanse las temperaturas en el apartado 2.9.1. de Materiales y Métodos). Esta estacionalidad en la producción ocular de MEL en la tenca se corresponde con resultados recientes en los que se demuestra que los receptores de MEL en la tenca también exhiben una marcada estacionalidad, con ritmos diarios significativos de su densidad en otoño/invierno, pero no en las estaciones de primavera o verano (López-Patiño, 2004). La inversión estacional entre los ritmos diarios de la indolamina y de sus receptores puede atribuirse o bien a fenómenos de desensibilización

por el propio ligando endógeno, como se ha sugerido para algunos mamíferos (Gauer y cols., 1993; Masson-Pévet y cols., 1993) y aves (Yuan y Pang, 1992), o bien a un control por osciladores circadianos de localización aún desconocida. Actualmente no disponemos de información suficiente en la tenca para defender alguna de estas posibilidades teóricas.

Cambios estacionales de MEL pineal y circulante se han investigado en varias especies de vertebrados ectotermos, encontrando en general ritmos de alta amplitud en verano y desaparición del ritmo diario durante el invierno (Pévet y cols., 1991). También en mamíferos fotoperiódicos hibernantes se ha observado la desaparición del ritmo de melatonina durante el invierno, periodo en el que la termogénesis se inactiva y, por tanto, la temperatura corporal disminuye (Florant y cols., 1984; Darrow y cols., 1986); mientras que en mamíferos no hibernantes la situación está invertida, siendo elevada la producción de melatonina en invierno y reduciéndose drásticamente en verano y otoño (Iason y Eblin, 1989; Vivien-Roels y cols., 1992).

Los estudios estacionales realizados en los peces muestran una variabilidad de resultados importante dependiendo de las especies. Así, en *C. auratus*, ciprinídeo como la tenca, la MEL plasmática muestra un ritmo estacional en el que la amplitud del máximo nocturno es mayor en junio y septiembre que en diciembre y marzo (Iigo y Aida, 1995), resultados similares a los obtenidos en la tenca. En el grupo de los salmónidos hay varios estudios publicados, con resultados más variables. En *Oncorhynchus tshawytscha* no se observan cambios estacionales ni de la actividad HIOMT ni de MEL en la pineal, si bien los muestreos se realizaron durante el día y en peces aclimatados a temperatura constante (Birks y Ewin, 1986). En la trucha ni la actividad AA-NAT ni la HIOMT alteran significativamente su perfil diario en peces capturados a mitad de invierno en comparación con peces de mitad de verano, aunque la actividad AA-NAT fue superior en invierno que en verano (Morton y Forbes, 1988). En un estudio muy posterior realizado en esta misma especie en condiciones que simulan las variaciones estacionales naturales, el ritmo diario de MEL plasmática, con niveles elevados durante la fase oscura y basales durante la fase luminosa, se conserva independientemente de las condiciones ambientales, si bien la amplitud del ritmo en condiciones de verano es superior a la de otras estaciones simuladas (Masuda y cols., 2003). En otro salmónido (*S. salar*) los cambios estacionales de MEL circulante se asemejan más a lo descrito en la tenca, con una correlación clara entre la duración diaria de MEL elevada y la duración de la fase oscura, siendo en el verano cuando se observa una mayor amplitud del ritmo de MEL (Randall y cols., 1995). En el caso de la lubina los resultados publicados son más complejos, ya que la MEL

circulante sigue un patrón estacional similar al de la tenca, con los niveles nocturnos de MEL plasmática más elevados en verano. Sin embargo, la MEL ocular presenta un máximo diurno en otoño e invierno, mientras que en verano y primavera no se observan variaciones diarias significativas (García-Allegue y cols., 2001), por lo que se ha sugerido que la MEL de origen ocular no contribuye de forma significativa a la MEL circulante en esta especie. Esta distinta respuesta estacional de la pineal y la retina corrobora la propuesta de una regulación y función diferenciales en ambos órganos para esta especie y otras próximas. No obstante, en la actualidad no tenemos indicios que justifiquen esta diversidad de respuestas encontrada en especies filogenéticamente muy próximas, en relación con la síntesis de MEL en dos componentes del sistema circadiano, la pineal y la retina.

Por tanto, en la tenca podemos afirmar que la MEL ocular funciona como una señal química de la oscuridad que proporciona información no sólo del momento del día sino también del momento del año. Esta doble función se logra gracias a que la producción de esta hormona sigue un ritmo diario que es sensible a los factores ambientales. De entre los factores ambientales que intervienen en la regulación de la producción rítmica de MEL en los vertebrados, el fotoperiodo ha sido el más investigado. La influencia del fotoperiodo en la regulación de la síntesis de MEL en los vertebrados está bien establecida, habiéndose demostrado en numerosos estudios una evidente correlación positiva entre la duración del incremento nocturno de los niveles de MEL y la duración de la escotofase en todos los grupos de vertebrados (mamíferos: Bartness y Goldman, 1989; aves: Follet y cols., 1985; reptiles: Underwood y Calaban, 1987 y anfibios: Delgado y Vivien-Roels, 1989). En los peces, varios estudios confirman esta regulación fotoperiódica de la síntesis pineal de MEL (*C. auratus*, Kezuka y cols., 1992; Iigo y cols., 1991, 1994b; Iigo y Aida, 1995; *O. mykiss*, Max y Menaker, 1992; *S. salar*, Randall y cols., 1995; *Halichoeres tenuispinnis*, Iigo y cols., 2003a), en todos los casos la duración de la elevación nocturna de MEL es mayor en fotoperiodos largos. En nuestro estudio estacional de producción ocular de MEL en la tenca no podemos confirmar una respuesta similar, ya que en las estaciones con los fotoperiodos más cortos (otoño e invierno) la síntesis rítmica de MEL se anula. La pequeña diferencia entre el número de horas de oscuridad en nuestros muestreos de primavera y verano no nos permite obtener conclusiones en relación con una regulación fotoperiódica de la duración de la producción nocturna de MEL. El efecto regulador del fotoperiodo se ejerce de forma independiente de la temperatura en algunos peces, como sucede en el carpín, en el que el aumento nocturno de MEL circulante está determinado exclusivamente por el ciclo diario luz/oscuridad, independientemente de la temperatura del agua (5, 15 o 25°C) (Iigo y Aida,

1995). Sin embargo, en otros teleósteos como la lubina (García-Allegue y cols., 2001) o la trucha arcoiris (Masuda y cols., 2003) la pineal transduce ambas informaciones ambientales, fotoperiodo y temperatura. En algunas especies de homeótermos también se produce esta regulación dual por fotoperiodo y temperatura, siendo la amplitud del pico nocturno de melatonina circulante mayor en fotoperiodos más cortos (Vivien-Roels y cols., 1992; Míguez y cols., 1996; Vivien-Roels y cols., 1997; Falcón y cols., 2003).

Según Bartness y Goldman (1989), la fase, la amplitud y la duración del ritmo de producción de MEL son variables potencialmente sujetas a modificaciones por factores ambientales. En el caso de la tenca, entre los parámetros que definen las funciones sinusoidales teóricas de los ritmos diarios de actividad AA-NAT y MEL, encontramos que la fase del ritmo apenas se modifica a lo largo del año, sin embargo el nivel medio o mésores y la amplitud muestran notables cambios estacionales. El nivel medio del ritmo es uno de los parámetros que más se modifica a lo largo de las estaciones en la retina de la tenca. El mésores del ritmo de actividad AA-NAT más elevado se encontró en invierno (coincidiendo con una producción mínima de MEL), mientras que el más bajo se halló en verano, cuando el ritmo de MEL muestra su mayor amplitud y su nivel medio más elevado. Este resultado, aparentemente, puede parecer paradójico, es decir, niveles diarios elevados de actividad AA-NAT durante el invierno no se corresponden con una producción alta de MEL. El mismo resultado se ha encontrado previamente en la retina de *R. perezii* (Delgado y cols., 1993), especie en la que la elevada sensibilidad térmica de la enzima AA-NAT ocular ( $Q_{10} = 2-3$ ) (Alonso-Gómez y cols., 1992) justifica la reducción de la actividad catalítica a bajas temperaturas, compensando de este modo el incremento en la cantidad de enzima inducido por el frío (Valenciano y cols., 1997). Es muy probable que en la tenca se produzca un fenómeno similar en el que los cambios estacionales de temperatura modulen la sensibilidad térmica de la enzima limitante de la ruta biosintética, lo que explicaría la baja producción ocular de MEL durante el invierno, aunque la actividad AA-NAT sea elevada. La influencia de la temperatura del agua sobre algunas de las actividades enzimáticas de la ruta de biosíntesis de MEL también se ha investigado en la pineal de la trucha arcoiris y del lucio (Falcón y cols., 1992).

Las diferencias estacionales en el nivel medio de AA-NAT probablemente se deban a modificaciones de la tasa de recambio de la enzima provocadas por la temperatura. En las estaciones frías dicha tasa se reduce, conduciendo a una acumulación de la enzima, aunque con una actividad catalítica limitada. Además, este enlentecimiento de la tasa de recambio explicaría la desaparición del ritmo diario de la enzima, ya que la mayor vida media de la misma amortiguaría el ritmo de expresión de la enzima, en otras palabras, las

moléculas de enzima sintetizadas *de novo* durante la noche no desaparecerían durante la fotofase siguiente.

Además de la acción de la temperatura sobre la AA-NAT hay que considerar los efectos que este factor ambiental puede ejercer sobre otras actividades enzimáticas que participan en la ruta biosintética de MEL, como la TPH y la L-AAAD, que actuando en pasos sucesivos, son las que determinan la disponibilidad de serotonina, sustrato de la AA-NAT. Estas enzimas han sido muy poco estudiadas, pero no deberían ignorarse ya que se ha descrito para la AA-NAT ocular en la rana un fenómeno de inhibición por sustrato dependiente de la temperatura (Alonso-Gómez y cols., 1993), que explica, al menos en parte, el incremento en la amplitud del ritmo de MEL, observado en muchas especies de poiquiloterms a elevadas temperaturas. Según este fenómeno, pequeños incrementos de la AA-NAT durante la escotofase provocan grandes aumentos en la capacidad sintética de melatonina en condiciones de elevada temperatura. A temperatura baja, propia del invierno, la inhibición por sustrato desaparece y, por lo tanto, también la capacidad de amplificación. Las variaciones estacionales descritas en el contenido de serotonina en la pineal de *Testudo hermanni* (Vivien-Roels y cols., 1979) y en el hipotálamo de *Heteropneustes fossilis* (Senthilkumara y Joy, 1993) apoyan esta hipótesis de la implicación de la serotonina en la regulación de la síntesis estacional de melatonina.

Las amplitudes de los ritmos de AA-NAT y MEL en la retina de la tenca varían notablemente a lo largo del ciclo estacional, registrándose los valores más altos en primavera-verano y verano, respectivamente, y los más bajos en otoño e invierno. A partir de estos resultados, podemos sugerir que en la tenca la temperatura ambiental desempeña un papel fundamental en la regulación de la amplitud del ritmo estacional de melatonina ocular. Sin embargo, es obvio que a lo largo del año los factores ambientales varían conjuntamente haciendo difícil discriminar si las variaciones estacionales observadas se deben al efecto de un único factor ambiental o por el contrario son el resultado de la acción combinada de varios de estos factores, por lo que para poder establecer la influencia de los diversos factores por separado se necesitan diseños experimentales con condiciones controladas en laboratorio donde cambiar únicamente uno de estos factores. Nuestros resultados obtenidos con tencas aclimatadas a condiciones controladas de laboratorio (12L:12D y dos temperaturas 25 y 5°C) corroboran lo observado en el estudio estacional. A 25°C observamos un marcado incremento tanto de la actividad AA-NAT como del contenido ocular de MEL durante la fase oscura del ciclo luz/oscuridad. Sin embargo, a temperatura baja ni la AA-NAT ni la MEL ocular

muestran diferencias día/noche. Por tanto, podemos concluir que en la tenca la amplitud de ambos ritmos está bajo el control de la temperatura ambiental.

La influencia de la temperatura del agua en la MEL circulante o en la MEL pineal se ha investigado en varias especies de poiquilotermos con diseños experimentales de aclimatación en el laboratorio a condiciones concretas de fotoperiodo y temperatura, y en muchos casos se ha encontrado que la temperatura ambiental interviene en el control de la producción de la indolamina, existiendo una clara correlación entre temperatura ambiental y amplitud del pico nocturno de melatonina ocular (Gern y cols., 1983; Vivien-Roels y cols., 1988; Delgado y cols., 1993; Valenciano y cols., 1994). Esta coincidencia de resultados en especies pertenecientes a todas las clases de vertebrados poiquilotermos indica un alto grado de conservación filogenética de la regulación térmica de la síntesis de melatonina en estos vertebrados. En los peces hay varios estudios dedicados a este aspecto de la regulación térmica de la producción de MEL. Así, tanto en experimentos *in vivo* como en cultivos de pineales, la amplitud del incremento nocturno de síntesis de MEL es mayor a temperaturas altas que a bajas, desapareciendo el ritmo diario de MEL a temperatura baja (*O. mykiss*, Max y Menaker, 1992; *C. commersoni*, Zachmann y cols., 1992a,c; *Petromyzon marinus*, Bolliet y cols., 1993; *E. lucius*, Falcón y cols., 1994; *C. auratus*, Iigo y Aida, 1995; *D. labrax*, García-Allegue y cols., 2001; *Lampetra japonica*, Samejima y cols., 2002). Nuestros resultados, acordes con esta regulación térmica de la síntesis de MEL en la pineal, amplían esta relación a la retina de la tenca. No obstante, en otros teleósteos, como la trucha arcoiris (Masuda y cols., 2003) y la lubina (García-Allegue y cols., 2001) en el control de la amplitud nocturna de la producción de MEL pineal interviene una combinación de fotoperiodo y temperatura del agua. Esta regulación dual por fotoperiodo y temperatura de la síntesis de MEL podría tener un carácter adaptativo importante para ajustar numerosas funciones estacionales con el ambiente, ya que en dos momentos muy distintos del ciclo estacional (en los solsticios y los equinoccios) los animales están expuestos a fotoperiodos similares pero las temperaturas pueden ser muy diferentes (Delgado y cols., 1993).

En nuestro experimento de aclimatación térmica encontramos que la exposición durante 3 semanas a temperatura baja (5 °C) es suficiente para anular la ritmicidad diaria de AA-NAT y de MEL, pero no parece ser un tiempo lo suficientemente largo como para incrementar significativamente la actividad AA-NAT nocturna. Este estudio se realizó en el mes de junio y pensamos que la historia térmica previa de las tencas marca el ritmo estacional de producción de MEL de forma lo suficientemente robusta como para que con una exposición de 3 semanas se detecte una anulación del ritmo pero no se logre un

incremento significativo de la actividad enzimática, similar al observado en condiciones naturales durante el invierno. Un lento recambio de la actividad enzimática a bajas temperaturas corrobora esta posible explicación.

Si tenemos en cuenta que los organismos están expuestos en la naturaleza tanto a ciclos fotoperiódicos como termoperiódicos, una cuestión interesante, pero menos estudiada, es si los ciclos de temperatura pueden sincronizar el ritmo de producción de MEL y encarrilar el reloj. En algunos poiquilotermos, fotoperiodo y termoperiodo, parecen interactuar en la determinación de la amplitud y la duración del ritmo de MEL (Zachmann y cols., 1992a,c; Falcón y cols., 1994; Valenciano y cols., 1997). En la pineal del lucio en cultivo los ciclos de temperatura superpuestos a los fotociclos aumentan la amplitud del ritmo cuando la criofase coincide con la escotofase, y reducen la amplitud en la situación contraria (coincidencia de criofase y fotofase, Falcón y cols., 1994). Sin embargo lo contrario sucede en la pineal de *C. commersoni* (Zachman y cols., 1992c) y en la retina de *Rana perezi* (Valenciano y cols., 1997). Por tanto, los efectos de los termociclos parecen ser complejos y variables dependiendo de las especies.

Teniendo en cuenta el carácter fotorreceptor tanto de las células del órgano pineal de peces y anfibios, como de los propios fotorreceptores retinianos, resulta sencillo entender la fototransducción ambiental realizada por ambos órganos en estos vertebrados, y la expresión de la síntesis de MEL como señal de oscuridad para estos animales. Incluso, en ciertas especies se ha propuesto que las células fotorreceptoras de la pineal contienen los osciladores celulares del reloj circadiano (lucio, Bolliet y cols., 1997). Sin embargo ¿qué elementos celulares en la pineal o la retina son los encargados de la transducción de la temperatura ambiental? En la actualidad es una cuestión para la que aún no tenemos respuesta, pero se ha sugerido la participación de proteínas de choque térmico que pueden estar involucradas en el mecanismo de compensación térmica o en la propia transducción de los cambios de temperatura (Barrett y Takahashi, 1995). Estudios recientes de nuestro equipo de investigación han demostrado que esta influencia de la temperatura en la transducción de la señal de la MEL se establece también a nivel de los receptores de la hormona en distintos tejidos diana. De hecho, la unión de la melatonina a sus receptores en el techo óptico y la retina de la tenca (López-Patiño, 2004) y de *R. perezi* (Isorna y cols., 2004) muestra una elevada termosensibilidad, evaluada tanto en curvas de saturación por el ligando 2-iodoMEL, como en sus cinéticas de asociación y disociación.



#### 4.2. CARÁCTER ENDÓGENO DE LA SÍNTESIS RÍTMICA DE MELATONINA Y DE LA ACTIVIDAD AA-NAT.

Una cuestión que despierta mucho interés en relación con la producción de MEL es si se trata de un ritmo endógeno, o por el contrario está regulado por condiciones ambientales, existiendo en la bibliografía numerosos trabajos que investigan dicho carácter endógeno en la pineal de vertebrados, pero un número muy reducido en la retina. Nosotros hemos abordado el estudio de esta cuestión en la retina de la tenca mediante una aproximación *in vivo*, encontrando que el ritmo diario del contenido ocular de MEL y de actividad AA-NAT, que se observa en ciclos L:D, se pierde en condiciones de curso libre, por lo que, en principio, descartamos la existencia de una ritmicidad circadiana endógena en la retina de esta especie.

En la mayoría de los vertebrados no mamíferos estudiados, el órgano pineal contiene el sistema circadiano completo de producción de MEL, es decir el elemento fotorreceptor, el oscilador circadiano y las enzimas necesarias para la síntesis de MEL (Pickard y Tang, 1994; Falcón y cols., 1992; Murakami y cols., 1994; Cahill, 1996; Bolliet y cols., 1997). El ritmo de MEL ocular, en general en los mamíferos, no es endógeno, sino que está controlado por el ciclo luz/oscuridad (Tosini, 2000). Por el contrario, en los vertebrados no mamíferos investigados existe un sistema autosostenido similar al de la pineal (Zawilska e Iuvone, 1992; Cahill, y Besharse, 1993, 1995; Cahill, 1996), siendo numerosos los trabajos realizados en la retina de pollo (Bernard y cols., 1997, 1999; Chong y cols., 2000; Haque y cols., 2002; Ivanova e Iuvone, 2003) y de *Xenopus* (Besharse e Iuvone, 1983; Cahill y Besharse, 1993).

En los peces también tenemos que distinguir entre el ritmo de MEL en el tejido ocular y en la pineal. En la pineal de los peces podemos encontrar las dos opciones, especies en las que el ritmo de MEL está controlado por relojes circadianos y persiste en condiciones de oscuridad constante, con niveles elevados durante la noche subjetiva y bajos durante el día subjetivo, como el carpín (Kozuka y cols., 1989, Iigo y cols., 1991), lucio (Falcón y cols., 1987; Bégay y cols., 1998), pez cebra (Cahill, 1996), *Poecilia velifera* (Okimoto y Stetson, 1999), *Lampetra japonica* (Samejima y cols., 1997, 2002) y *Plecoglossus altivelis* (Iigo y cols., 2004); y especies de peces en las que el ritmo de MEL pineal no es endógeno, sino que está regulado por factores ambientales, y se anula al exponer a la pineal a condiciones de oscuridad constante, como sucede en el pez gato (Zachmann y cols., 1992a, Bolliet y cols., 1995) y varios salmónidos (*S. trutta*, Max y Menaker, 1992; *O. mykiss*, Gern y Greenhouse, 1988; Mizusawa y cols., 2000; Masuda y cols., 2003; *O. masou* Iigo y cols., 1997b). Curiosamente el ayu (*Plecoglossus altivelis*)

parece una excepción entre los salmoniformes, ya que contiene un reloj intrapineal que regula la producción rítmica de MEL (Iigo y cols., 2003b), si bien aun siendo del orden Salmoniformes no es de la misma familia (Fam. Osmeridae frente a la Salmonidae).

No obstante, en alguna especie existen resultados aparentemente contradictorios, como sucede en la pineal de la lubina, que muestra ritmicidad endógena en cultivo pero no *in vivo* (Iigo y cols., 1997c). O el caso del lucio, cuya pineal en cultivo conserva la producción rítmica de MEL en DD si la temperatura es superior a 19 °C, pero a temperaturas inferiores a 15 °C el oscilador se anula (Bolliet y cols., 1994). Además, en la mayoría de las especies analizadas, aún mostrando una ritmicidad endógena que se conserva durante varios días en condiciones DD, el ritmo de MEL desaparece en condiciones de exposición a luz constante. Este resultado no contradice la existencia de oscilador sino que más bien se justifica por el bien conocido efecto inhibitorio de la luz sobre la síntesis de MEL, tanto en células fotorreceptoras como en pinealocitos. En la tenca no se ha investigado si el ritmo de MEL pineal es endógeno, si bien uno de los objetivos inmediatos de nuestro equipo es estudiar la posible existencia de relojes biológicos en ciertas regiones encefálicas de la tenca, ya que algunos estudios apuntan a otras regiones encefálicas distintas de la pineal como lugares de localización de relojes biológicos en los peces. Por ejemplo, el techo óptico parece alojar el reloj endógeno en *O. mykiss* (Mazurais y cols., 2000).

A pesar de que la retina es un elemento fundamental del sistema circadiano en los vertebrados, su estudio ha sido, en general, relegado frente al esfuerzo dirigido al conocimiento de la funcionalidad del órgano pineal, existiendo mucha menos información sobre el sistema generador de MEL en el ojo. En los peces, concretamente, la ritmicidad endógena de la producción ocular de MEL se ha investigado en muy pocas especies, y principalmente a través de los ritmos diarios de actividad AA-NAT. El contenido ocular de MEL en *Halichoeres tenuispinnis* sigue un ritmo diario que se mantiene en condiciones de iluminación constante (Iigo y cols., 2003a), pero no sucede así en otras especies. Por ejemplo en el lucio, aunque los ritmos del ARNm de la AA-NAT ocular parecen persistir independientemente del ciclo de luz ambiental, no sucede así para los ritmos de actividad AA-NAT (Mizusawa y cols., 2000; Falcón y cols., 2003). En el pez cebra no se ha podido demostrar la existencia de oscilador en la retina, a diferencia de lo que sucede en la pineal (Cahill, 1996), lo que llevó a los autores a cuestionarse si las condiciones del cultivo de la retina no eran suficientemente adecuadas para poder observar la producción rítmica de MEL después de varios días de cultivo. En nuestro estudio, que utiliza una aproximación *in vivo*, esta posible limitación metodológica no existe, y los resultados

sugieren que el ritmo de MEL ocular no es endógeno. Por lo que en principio, parece que el ritmo endógeno de síntesis de MEL en la retina se ha perdido, incluso en especies que sí lo conservan para la pineal, poniendo de manifiesto diferencias marcadas entre el funcionamiento del sistema productor de MEL en la pineal y en la retina.

Una de las explicaciones más sencillas a esta pérdida del oscilador y apoyada en pruebas recientes obtenidas en experimentos realizados con mutaciones de genes reloj ha sido sugerida por Falcón (1999), quien propone que la ausencia de oscilador puede deberse a una simple mutación que provoque su pérdida. En especies como *D. rerio*, que sí tiene oscilador en pineal pero no en retina, se supone que la mutación debe haberse producido en algún punto que afecte sólo al oscilador de la retina, pero en especies como *O. mykiss*, que no lo tiene ni en pineal ni en retina, si la hipótesis es cierta, la mutación debería haber alterado algún gen que esté afectando a ambos órganos productores de la indolamina.

Por último, queremos exponer otra hipótesis que explicaría el por qué algunas especies conservan la ritmicidad de la melatonina en condiciones constantes y otras no. Hay que tener en cuenta que tanto la pineal como la retina son órganos pluricelulares y, por lo tanto, tienen una estructura de multioscilador. Partiendo de esta premisa, la diferencia entre las especies no se debería a la presencia o ausencia de un reloj, sino a la capacidad de acoplamiento entre las distintas células que forman el órgano. En las especies que muestran un claro ritmo endógeno, el acoplamiento intercelular estaría muy desarrollado, por lo tanto, todas las células oscilarían al unísono durante largos periodos de tiempo en condiciones constantes. En cambio, en otras especies, aunque cada célula individual se siga comportando como un oscilador, sino están fuertemente acopladas entre sí, en el momento en el que se establecen las condiciones constantes, cada célula oscilaría con un ritmo propio produciéndose desfases entre ellas. En este sistema desacoplado, el parámetro rítmico analizado (MEL, por ejemplo) representaría la media de todas las células individuales y, por lo tanto, no se manifestaría el carácter rítmico. El apoyo experimental de esta hipótesis se basa en la observación de que en muchos sistemas oscilatorios en condiciones constantes, la ritmicidad sólo se mantiene durante los primeros ciclos, perdiéndose progresivamente el ritmo, pero estos sistemas recuperan la ritmicidad si son sometidos a un estímulo encarrilador como puede ser un pulso de luz (Iigo y cols., 1991, 2003b, 2004). Además, el acoplamiento de los distintos osciladores puede depender de múltiples factores endógenos o exógenos, por ejemplo, la temperatura puede afectar a este acoplamiento, lo que explicaría los resultados obtenidos en la pineal del lucio por Bolliet y colaboradores (1994). Por tanto, la prueba experimental

definitiva para poder excluir la existencia de un oscilador endógeno en una especie en concreto, debería hacerse a nivel unicelular. Desafortunadamente, este abordaje experimental resulta muy complejo en la mayoría de los casos, y sólo en algunos sistemas como las neuronas del NSQ de mamíferos se han logrado aislar y demostrar la presencia de un ritmo endógeno (Nakamura y cols., 2001).

Por tanto, podríamos concluir que una ritmicidad endógena de la MEL puede no ser un fenómeno universal en los vertebrados, sino que es muy variable si comparamos la pineal y la retina, y tampoco podemos trazar en la actualidad líneas generales para grupos de vertebrados concretos. Por ejemplo en las aves, la presencia de osciladores intraoculares parece estar muy extendida, sin embargo en los anfibios se dan las dos opciones, existencia de reloj en *Xenopus* (Besharse e Iuvone, 1983; Cahill y Besharse, 1993) y ausencia en *Rana*, tanto en estudios *in vivo* (Wiechmann, 1986) como *in vitro* (Isorna, 1999); y en los peces tenemos una situación similar a la de los anfibios. Entre las posibles hipótesis que se pueden plantear, nuestro equipo ha sido tradicionalmente favorable a sugerir posibles relaciones entre la latitud del hábitat que ocupa una especie y su necesidad de ritmos endógenos. Así, en especies de latitudes tropicales, donde los cambios estacionales de factores ambientales, como la luz y la temperatura son muy leves, un reloj endógeno tiene gran utilidad, pero no sería así en animales de climas templados o árticos (expuestos a fotoperiodos naturales que exhiben variaciones periódicas fijas) en los que una variación estacional en la producción de MEL regulada por dichos cambios ambientales sería muy útil como señal endocrina que codifica la información ambiental para regular múltiples funciones estacionales. Por ejemplo, *Xenopus laevis* es un anfibio de origen tropical y *Rana pipiens* y *R. perezi* habitan en zonas templadas. En el caso de los peces, los salmónidos generalmente ocupan zonas más septentrionales del planeta. También se ha sugerido para ciprínidos, que el distinto nicho ecológico puede influir; por ejemplo *Zacco platypus* no posee ritmo endógeno, pero *Tribolodon hakonensis* sí, aunque ambos habitan la misma zona geográfica pero distintos nichos (Iigo y cols., 1997b).

En la actualidad ignoramos cuáles pueden haber sido los factores principales que han dirigido la evolución de las diferencias existentes en el sistema que genera el ritmo de MEL en la pineal y en la retina. Una de las explicaciones más inmediatas es la diferente funcionalidad desempeñada por la MEL procedente de ambos órganos. En el caso de la pineal la MEL se sintetiza y libera a la circulación, donde constituye una señal endocrina del ciclo luz/oscuridad, y a pesar de una cierta plasticidad, esta señal parece estar muy bien conservada a lo largo de la filogenia. Sin embargo, en la retina no está tan

claro, pues en ciertas especies la MEL ocular mantiene únicamente una función local, intraocular, sin pasar a la circulación general, y sin embargo en otras contribuye de forma importante a la MEL plasmática.

Una de las cuestiones que aún permanecen sin resolver es dónde se sitúa los marcapasos que conducen el ritmo de MEL ocular en las especies que lo poseen. Se tienen datos que señalan a los fotorreceptores como los elementos celulares que contienen la maquinaria completa para que el reloj funcione. En el lucio (Bolliet y cols., 1997) en una preparación celular mediante gradientes de Percoll demuestra que son los fotorreceptores de la pineal del lucio, aislados de otros tipos celulares los que contienen el reloj circadiano, la capacidad fotorreceptora y la secreción circadiana de MEL.



## **VI. CONCLUSIONES**





1. Los parámetros hematológicos relacionados con ambas series celulares, roja y blanca, en el teleósteo *T. tinca*, muestran oscilaciones diarias cuyo perfil y amplitud varían dependiendo de las estaciones. Esta variabilidad diaria y anual de los parámetros sanguíneos, ya sea dependiente de los factores ambientales, o debida a la existencia de un oscilador endógeno, debe tenerse en cuenta al utilizar valores hematológicos de referencia como indicadores del estado fisiológico en los peces.
2. El mayor número de glóbulos rojos y blancos en verano respecto a otras estaciones puede estar relacionado con la menor disponibilidad de oxígeno y la menor calidad del agua, respectivamente, en esta época del año. Por tanto, cambios en la hematología de la tenca pueden utilizarse como indicativos útiles en la detección de alteraciones de origen natural o artificial en su medio acuático natural, con una potencial aplicación en el cultivo de esta especie.
3. Las reservas energéticas en la tenca experimentan marcados cambios anuales probablemente relacionados con el ciclo reproductor y el patrón estacional de alimentación. Las reservas hepáticas en la tenca, tanto proteicas como glucídicas son utilizadas principalmente para satisfacer las elevadas demandas energéticas que conlleva el desarrollo gonadal estacional, estando estimuladas en las estaciones previas a la freza. El periodo de ayuno invernal que experimenta la tenca en condiciones naturales impone notables adaptaciones metabólicas dirigidas a cubrir los requerimientos energéticos durante el invierno. La tenca utiliza el hígado y el músculo dorsal como importantes órganos de reserva de glucógeno y el músculo ventral como principal lugar de almacén estacional.
4. Las correlaciones encontradas entre distintos parámetros analizados en este estudio nos permiten sugerir diferentes funciones del NPY en las dos localizaciones encefálicas investigadas, el hipotálamo y el telencéfalo. La correlación entre las variaciones estacionales del contenido de NPY hipotalámico y la ingesta, así como su ritmicidad diaria apuntan a una participación del neuropéptido en la regulación estacional del apetito en la tenca. Sin embargo, el NPY telencefálico parece estar implicado en otras funciones no relacionadas con procesos cíclicos diarios.
5. La ghrelina en la tenca muestra un ritmo diario significativo en junio, con valores nocturnos superiores a los diurnos. Se desconoce el posible significado funcional de este ritmo, pero podría estar relacionado con la actividad alimentaria nocturna de esta especie. Por otro lado, los elevados niveles circulantes de ghrelina encontrados tras la freza favorecerían, al menos en parte a través de una posible estimulación de la

ingesta, una ganancia de peso corporal y la concomitante recuperación de las reservas energéticas.

6. El marcado dimorfismo sexual mostrado por la leptina en sus interacciones con otros reguladores de la ingesta, así como con distintos parámetros corporales de la tenca, podría revelar una distinta funcionalidad en machos y hembras de esta especie. El fuerte descenso de la leptina circulante en primavera facilitaría el inicio de la recuperación de las reservas energéticas, al desaparecer el posible efecto inhibitorio ejercido por esta hormona sobre la ingesta y el peso corporal. Este descenso, además, puede ser una respuesta al ayuno experimentado por los peces durante los meses fríos precedentes. Los elevados niveles de leptina encontrados en la tenca en otoño e invierno podrían estar promoviendo la movilización de las reservas lipídicas necesarias para la síntesis de esteroides sexuales y la vitelogénesis.
7. Las variaciones estacionales del contenido monoaminérgico hipotalámico en la tenca corroboran estudios previos en los que se pone de manifiesto su implicación funcional en la regulación del apetito en esta especie. La baja actividad dopaminérgica en primavera, tras un periodo de ayuno prolongado, puede ser interpretada como reducción de una señal anorética, permitiendo un incremento importante de la ingesta dirigida a la recuperación de las reservas energéticas que se han agotado durante el invierno. La NA, al igual que la ghrelina, presenta modificaciones estacionales encaminadas a la recuperación de las reservas energéticas agotadas tras el desove, posiblemente gracias a su papel como agente orexigénico. Además, cabe plantear una posible relación entre el contenido hipotalámico de monoaminas y el ciclo reproductor de la tenca.
8. La retina es un componente importante del sistema circadiano en la tenca, produciendo melatonina con una marcada ritmicidad diaria y estacional. La temperatura ambiental, al igual que sucede en otros poiquilotermos, es un factor clave regulador de la amplitud del ritmo diario de melatonina. La retina de la tenca no parece poseer un oscilador endógeno que regule el ritmo de MEL ocular, sino que la síntesis de la indolamina dependería exclusivamente de la información ambiental. En definitiva, la melatonina ocular en la tenca puede actuar como una señal sincronizadora interviniendo en la regulación de distintas funciones fisiológicas que muestran una ritmicidad diaria y/o estacional.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- ACUÑA-CASTROVIEJO, D., REITER, R.J., MENÉNDEZ-PELÁEZ, A., PABLOS, M.I. y BURGOS, A. (1994). Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J.Pineal Res.* **16**:100-112.
- ADÁMECK, Z., SUKOP, I., RENDÓ MORENO, P. y KOUŘIL, J. (2003). Food competition between 2+ tench (*Tinca tinca* L.), common carp (*Cyprinus carpio* L.) and bigmouth buffalo (*Ictiobus cyprinellus* Val.) in pond polyculture. *J.Appl.Icthyol.* **19**:165-169.
- ADRIO, F., ANADÓN, R. y RODRÍGUEZ-MOLDES, I. (1999). Distribution of serotonin (5-HT)-immunoreactive structures in the central nervous system of two chondrosteian species (*Acipenser baeri* and *Huso huso*). *J.Comp.Neurol.* **407**:333-348.
- AFFONSO, E.G., POLEZ, V.L.P., CORREA, C.F., MAZON, A.F., ARAUJO, M.R.R., MORAES, G. y RANTIN, F.T. (2002). Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hipoxia. *Comp.Biochem.Physiol.* **133C**:375-382.
- AHIMA, R.S. y FLIER, J.S. (2000). Leptin. *Ann.Rev.Physiol.* **62**:413-437.
- AHIMA, R.S. y OSEI, S.Y. (2004). Leptin signaling. *Physiol.Behav.* **81**:223-241.
- AHIMA, R.S., PRABAKARAN, D., MANTZOROS, C., QU, D., LOWELL, B., MARATOS-FLIER, E. y FLIER, J.S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* **382**:250-252.
- AHIMA, R.S., SAPER, C.B., FLIER, J.S. y ELMQUIST, J.K. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front.Neuroendocrinol.* **21**:263-307.
- AHRÉN, B. (2000). Diurnal variation in circulating leptin is dependent on gender, food intake and circulating insulin in mice. *Acta Physiol.Scand.* **169**:325-331.
- AKABAYASHI, A., LEVIN, N., PAEZ, X., ALEXANDER, J.T. y LEIBOWITZ, S.F. (1994). Hypothalamic neuropeptide Y and its gene expression: relation to light/dark cycle and circulating corticosterone. *Mol.Cell.Neurosci.* **5**:210-218.
- ALCORN, S.W., MURRA, A.L. y PASCHO, R.J. (2002). Effects of rearing temperature on immune functions in socke salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish Shellfish Immunol.* **12**:303-334.
- ALI, M.A. (Ed.) (1992). *Rhythms in fishes*. Plenum Press, New York. pp. 348.
- ALONSO-GÓMEZ, A.L., ALONSO-BEDATE, M. y DELGADO, M.J. (1992). Thermal sensitivity and effect of temperature acclimation on ocular serotonin N-acetyltransferase activity in *Rana perezi*. *Neurosci.Lett.* **142**:187-190.
- ALONSO-GÓMEZ, A.L., ALONSO-BEDATE, M. y DELGADO, M.J. (1993). The inhibition by indoleamines (tryptamine and serotonin) of ocular serotonin-N-acetyltransferase from *Rana perezi* is temperature dependent. *Neurosci.Lett.* **155**:33-36.
- ALONSO-GÓMEZ, A.L., LÓPEZ-PATÍÑO, M.A., GUIJARRO, A.I., ISORNA, E., DE PEDRO, N., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (2004). Characterization and rhythmicity of central and peripheric melatonin binding sites of tench (*Tinca tinca* L.). 5<sup>th</sup> International Symposium on Fish Endocrinology. September, 5-9, 2004.
- ALONSO-SOLÍS, R. (1992). Neurotransmisores y neuromoduladores. En: *Fisiología humana*. (Ed.: Tresguerres, J.A.F.). Interamericana McGraw-Hill, Madrid. pp. 63-86.
- ÁLVAEZ, F., RAZQUIN, B.E., VILLENA, A.J. y ZAPATA, A.G. (1998). Seasonal changes in the lymphoid organs of wild brown trout. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **64**:267-278.

- AMANO, M., IIGO, M., IKUTA, K., KITAMURA, S. e YAMAMORI, K. (2003). Daily variations in melatonin binding sites in the masu salmon brain. *Neurosci.Lett.* **350**:9-12.
- ANDO, Y., SHIMOYAMA, A. y OTA, T. (1996). Changes in positional distribution of fatty acids in dorsal muscle triacyl-sn-glycerols from chum salmon, *Oncorhynchus keta*, at spawning season. *Comp.Biochem.Physiol.* **113B**:89-93.
- ANGELIDIS, P., BAUDIN-LAURENCIN, F. e YOUINOU, P. (1988). Effects of temperature on chemiluminescence of phagocytes from sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J.Fish Dis.* **11**:281-288.
- ARANDA, A., MADRID, J.A. y SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2001). Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *J.Biol.Rhythms* **16**: 50-57.
- ARENDT, J. (1985). Mammalian pineal rhythms. *Pineal Res. Rev.* **3**:161-213.
- ARENDT, J. (1995). Melatonin and the mammalian pineal gland. Chapman and Hall, London.
- ARENDT, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev.Reprod.* **3**:13-22.
- ARÉVALO, M.V. y DURÁN, A. (1988). Variación estacional de grasa y proteína de la trucha común (*Salmo trutta fario*) en los tramos alto y medio del río Tormes. *Investigaciones Agrarias: Producción y Sanidad Animal* **3**:2-3.
- ARMSTRONG, S.M., CASSONE, V.M., CHESWORTH, M.G. y REDMAN, J.R. (1986). Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J.Neural.Transm.* **21**:371-375.
- ARUTIUNIAN, A.V., KERKESKO, G.O., STEPANOV, M.G. y POZDEEV, N.V. (2001). Disruption of circadian rhythms of biogenic amines in rat hypothalamus upon administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Vopr.Onkol.* **47**:608-615.
- ARVIDSSON, A.K., WRAITH, A., JONSSON-RYLANDER, A.C. y LARHAMMAR, D. (1998). Cloning of a neuropeptide Y/peptide YY receptor from the Atlantic cod: the Yb receptor. *Regul.Peptides* **75/76**:39-43.
- ASAKAWA, A., INUI, A., KAGA, T., YUZURIHA, H., NAGATA, T., UENO, N., MAKINO, S., FUJIMIYA, M., NIJIMA, A., FUJINO, M.A. y KASUGA, M. (2001). Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* **120**:337-345.
- ASAKUMA, S., MORISHITA, H., SUGINO, T., KUROSE, Y., KOBAYASHI, S. y TERASHIMA, Y. (2003). Circulating leptin responses to feeding and exogenous infusion of insulin in sheep exposed to thermoneutral and cold environments. *Comp.Biochem.Physiol.* **134A**:329-335.
- ASAKUMA, S., HIRAKU, O., KUROSE, Y., KOBAYASHI, S. y TERASHIMA, Y. (2004). Diurnal rhythm of cerebrospinal fluid and plasma leptin levels related to feeding in non-lactating and lactating rats. *J.Endocrinol.* **180**:283-286.
- ASCHOFF, J. (1981). A survey of biological rhythms. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*, (Ed.: Aschoff.). Biological Rhythms. Plenum, New York. pp. 3-10.
- ATCHA, Z., CAGAMPANG, F.R.A., STIRLAND, J.A., MORRIS, I.D., BROOKS, A.N., EBLING, F.J.P., KLINGESPOR, M. y LOUDON, A.S.I. (2000). Leptin acts in metabolism in a photoperiod-dependent manner, but has no effect on reproductive function in the seasonally breeding Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* **141**:4128-4135.

- AUDET, D. y COUTURE, P. (2003). Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* **60**: 269-278.
- AUDET, C., BESNER, M., MUNROE, J. y DUTIL, J.D. (1993). Seasonal and diel variations of various blood parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). *Can.J.Zool.* **71**:611-618.
- AYRE, E.A. y PANG, S.F. (1994). 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in testis and ovary: putative melatonin receptors in the gonads. *Biol.Signals* **3**:71-84.
- BAANANTE, I.V., GARCÍA DE FRUTOS, P., BONAMUSA, L. y FERNÁNDEZ, F. (1991). Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P<sub>2</sub> and PKF-2. *Comp.Biochem.Physiol.* **100B**:11-17.
- BABIN, P.J. y VERNIER, J.M. (1989). Plasma lipoproteins in fish. *J.Lipid Res.* **30**:467-489.
- BAGNASCO, M., KALRA, P.S. y KALRA, S.P. (2002). Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats. *Endocrinology* **143**: 726-729.
- BAKER, D.M., LARSEN, D.A., SWANSON, P. y DICKHOFF, W.W. (2000). Long-term peripheral treatment of immature coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with human leptin has no clear physiologic effect. *Gen.Comp.Endocrinol.* **118**:134-138.
- BALASUBRAMANIAM, A. (2003). Neuropeptide Y (NPY) family of hormones: progress in the development of receptor selective agonist and antagonist. *Curr.Pharm.Des.* **9**:1165-1175.
- BALEMANS, M.G.M., HALDAR-MISRA, C., SMITH, I. y HENDRINKS, H. (1983). Day/night rhythmicity in the methylating capacities for different 5-hydroxyindoles in the pineal, retina and the Harderian gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) during annual seasons. *J.Neural Transm.* **56**:53-72.
- BANKS, W.A., TCHÖP, M., ROBINSON, S.M. y HEIMAN, M.L. (2002). Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **302**:822-827.
- BARASH, I.A., CHEUNG, C.C., WEIGLE, D.S., REN, H.P., KABIGTING, E.B., KUIJPER, J.L., CLIFTON, D.K. y STEINER, R.A. (1996). Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* **137**:3144-3147.
- BARNES, N.M. y SHARP, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**:1083-1152.
- BARRETT, R.H. y TAKAHASI, J.S. (1995). Temperature compensation and temperature entrainment of the chick pineal cell circadian clock. *J.Neurosci.* **15**:5681-5692.
- BARRIGA, C., MARTÍN, M.I., TABLA, R., ORTEGA, E. y RODRÍGUEZ, A.B. (2001). Circadian rhythm of melatonin, corticosterone and phagocytosis: effect of stress. *J.Pineal Res.* **30**:180-187.
- BARTNESS, T.J. y GLODMAN, B. (1989). Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia* **45**:939-945.
- BARTNESS, T.J., MORLEY, J.E. y LEVINE, A.S. (1986). Photoperiod-peptide interactions in the energy intake of Siberian hamsters. *Peptides* **7**:1079-1085.

- BARTNESS, T.J., BITTMAN, E.L., HASTINGS, M.H., POWERS, J.B. y GLODMAN, B. (1993). Timed melatonin infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiod control of seasonal responses? *J.Pineal Res.* **15**:161-190.
- BARTNESS, T.J., MORLEY, J.E. y LEVINE, A.S. (1995). Effects of food deprivation and metabolic fuel utilization on the photoperiodic control of food intake in Siberian hamsters. *Physiol.Behav.* **57**:61-68.
- BATES, H. y MYERS, M.G.JR. (2003). The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol.Metab.* **14**:447-452.
- BAYARRI, M.J., ROL DE LAMA, M.A., MADRID, J.A. y SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2003). Both pineal and lateral eyes are needed to sustain daily circulating melatonin rhythms in sea bass. *Brain Res.* **969**:175-182.
- BAYARRI, M.J., GARCÍA-ALLEGUE, R., MUÑOZ-CUETO, J.A., MADRID, J.A., TABATA, M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. e IIGO, M. (2004). Melatonin binding sites in the brain of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Zool.Sci.* **21**:427-434.
- BEAL, M.F., FRANK, R.C., ELLISON, D.W. y MARTIN, J.B. (1986). The effect of neuropeptide Y on striatal catecholamines. *Neurosci.Lett.* **71**:118-123.
- BEAUMONT, N.J., SKINNER, V.O., TAN, T.M., RAMESH, B.S., BYRNE, D.J., MACCOLL, G.S., KEEN, J.N., BOULOUX, P.M., MIKHAILIDIS, D.P., BRUCKDORFER, K.R., VANDERPUMP, M.P. y SRAI, K.S. (2003). Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J.Biol.Chem.* **278**:8877-8880.
- BECK, B., STRICKER-KRONRAD, A., BURLET, A., NICOLAS, J.P. y BURLET, C. (1990). Influence of diet composition on food intake and hypothalamic neuropeptide Y (NPY) in the rat. *Neuropeptides* **17**:197-203.
- BECK, B., STRICKER-KRONRAD, A., BURLET, A., NICOLAS, J.P. y BURLET, C. (1992). Specific hypothalamic neuropeptide Y variation with diet parameters in rats with food choice. *Neuroreport* **3**:571-574.
- BECK, B., STRICKER-KRONRAD, A., BURLET, A., CUMIN, F. y BURLET, C. (2001). Plasma leptin and hypothalamic neuropeptide Y and galanin levels in Long-Evans rats with marked dietary preferences. *Nutr.Neurosci.* **4**:39-50.
- BECK, B., MUSSE, N. y STRICKER-KRONRAD, A. (2002). Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in Long-Evans rats. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **292**:1031-1035.
- BECK-SICKINGER, A.G. (1997). The importance of various parts of the NPY molecule for receptor recognition. En: *Neuropeptide Y and drug development*. (Eds.: Grundeman, L. y Bloom, S.R.). Academic Press, San Diego. pp. 107-126.
- BEDNAR, I., CARRE, H., QUREHI, G.A. y SÖDERSTEN, P. (1995). Dopamine D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> antagonist enhance inhibition of consummatory ingestive behavior by CCK-8. *Am.J.Physiol.* **269**:R896-R903.



- BÉGAY, V., FALCÓN, J., CAHILL, G.M., KLEIN, D.C. y COON, S.L. (1998). Transcripts encoding two melatonin synthesis enzymes in the teleost pineal organ: circadian regulation in pike and zebrafish, but not in trout. *Endocrinology* **139**:905-912.
- BEHRE, H.M., SIMONI, M. y NIESCHLAG, E. (1997). Strong association between serum levels of leptin and testosterone in men. *Clin.Endocrinol.* **47**:237-240.
- BELL, J.C. (1998). Current aspects of lipid nutrition in fish farming. En: *Biology of farmed fish*. (Eds.: Black, K.D. y Pickering, A.D.). Sheffield Academic Press, Sheffield. pp. 114-145.
- BENNET, P.A., LINDELL, K., KARLSSON, C., ROBINSON, I.C., CARLSSON, L.M. y CARLSSON, B. (1998). Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen. *Neuroendocrinology* **67**:29-36.
- BENNET, P.A., LINDELL, K., WILSON, C., CARLSSON, L.M., CARLSSON, B. y ROBINSON, I.C. (1999). Cyclical variations in the abundance of leptin receptors, but not in circulating leptin, correlate with NPY expression during the oestrus cycle. *Neuroendocrinology* **69**:417-423.
- BENYASSI, A., SCHWARTZ, C., COON, S.L., KLEIN, D.C. y FALCÓN, J. (2000). Melatonin synthesis: arylalkylamine N-acetyltransferase in trout retina and pineal organ are different. *Neuroreport* **11**:255-258.
- BERG, O.K. y BREMSET, G. (1998). Seasonal changes in the body composition of young riverine Atlantic salmon and brown trout. *J.Fish Biol.* **52**:1272-1288.
- BERNARD, M., IUVONE, P.M., CASSONE, V.M., ROSEBOOM, P.H., COON, S.L. y KLEIN, D.C. (1997). Avian melatonin synthesis: photic and circadian regulation of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland and retina. *J.Neurochem.* **68**:213-224.
- BERNARD, M., GUERLOTTE, J., GREVE, P., GRECHEZ-CASSIAU, A., IUVONE, P.M., ZATZ, M., CHONG, N.W., KLEIN, D.C. y VOISIN, P. (1999). Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina. *Reprod.Nutr.Dev.* **39**:325-334.
- BERNARDIS, L.L. y BELLINGER, L.L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **20**:189-287.
- BERNIER, N.J. y PETER, R.E. (2001). The hypothalamic-pituitary-interrenal axis and the control of food intake in teleost fish. *Comp.Biochem.Physiol.* **129B**:639-644.
- BERNIER, N.J., LIN, X. y PETER, R.E. (1999). Differential expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and urotensin I precursor genes, and evidence of CRF gene expression regulated by cortisol in goldfish brain. *Gen.Comp.Endocrinol.* **116**:461-477.
- BERNIER, N.J., BEDARD, N. y PETER, R.E. (2004). Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. *Gen.Comp.Endocrinol.* **135**:230-240.
- BERTHOUD, H.R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci.Behav.Rev.* **26**:393-428.
- BESHARSE, J.C. e IUVONE, P.M. (1983). Circadian clock in *Xenopus* eye is controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature* **305**:133-135.

- BHATNAGAR, S. y SAKSENA, D.N. (1989). Observation on certain haematological and biochemical parameters of blood in an air teleost, *Clarias batrachus* (Linn.). *J.Anim.Morphol.Physiol.* **36**:163-168.
- BING, C., FRANKISH, H.M., PICKAVANCE, L., WANG, Q., HOPKINS, D.F., STOCK, M.J. y WILLIAMS, G. (1998). Hyperphagia in cold-exposed rats is accompanied by decreased plasma leptin but unchanged hypothalamic NPY. *Am.J.Physiol.* **274**:R62-R68.
- BIRKS, E.K. y EWING, R.D. (1986). Seasonal changes in the pineal melatonin content and hydroxyindole-O-methyltransferase activity in juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **64**:91-98.
- BLACK, D. y SKINNER, E.R. (1987). Changes in plasma lipoproteins and tissue lipoproteins lipase and salt-resistant lipase activities during spawning in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp.Biochem.Physiol.* **88B**:261-267.
- BLACK, D., YOUSSEF, A.M. y SKINNER, E.R. (1983). The mechanism of lipid uptake by tissues in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Biochem.Soc.Trans.* **11**:93-94.
- BLAXHALL, P.C. y DAISLEY, K.W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *J.Fish Biol.* **5**:771-781.
- BLOMQVIST, A.G. y HERZOG, H. (1997). Y-receptor subtypes-how many more? *Trends Neurosci.* **20**:294-298.
- BLUNDELL, J.E. y HILL, A.J. (1989). Do the serotonergic drugs decrease energy intake by reducing fat or carbohydrate intake?. Effect of d-fenfluramine with supplement weight-increasing diets. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **31**:773-778.
- BOEUF, G. y FALCÓN, J. (2001). Photoperiod and growth in fish. *Vie Milieu Life Environment* **51**:47-266.
- BOEUF, G. y LE BAIL, P.Y. (1999). Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* **177**:129-152.
- BOLLIET, V., ALI, M.A., ANCTIL, M. y ZACHMANN, A. (1993). Melatonin secretion *in vitro* from the pineal complex of the lamprey *Petromyzon marinus*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **89**:101-106.
- BOLLIET, V., BÉGAY, V., RAVAUULT, J.P., ALI, M.A., COLLIN, P. y FALCÓN, J. (1994). Multiple circadian oscillators in the photosensitive pike pineal gland: a study using organ and cell. *J.Pineal Res.* **16**:77-84.
- BOLLIET, V., FALCÓN, J. y ALI, M.A. (1995). Regulation of melatonin secretion by light in the isolated pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*). *J.Neuroendocrinol.* **7**:535-542.
- BOLLIET, V., ALI, M.A., LAPOINTE, F.J. y FALCÓN, J. (1996). Rhythmic melatonin secretion in different teleost species: an *in vitro* study. *J.Comp.Physiol.* **165B**: 677-683.
- BOLLIET, V., BÉGAY, V., TARAGNAT, C., RAVAUULT, J.P., COLLIN, P. y FALCÓN, J. (1997). Photoreceptors cells of the pike pineal organ as cellular circadian oscillators. *Eur.J.Neurosci.* **9**:643-653.
- BON, E., CORRAZE, G., KAUSHIK, S. y LE MENN, F. (1997). Effects of accelerated photoperiod regimes on the reproductive cycle of the female rainbow trout: I – Seasonal variations of plasma lipids correlated with vitellogenesis. *Comp.Biochem.Physiol.* **118A**:183-190.

- BONN, U. (1990). NPY-like immunoreactivity in the brain of the teleost *Tinca tinca* (Cyprinidae). *J.Hirnforsch.* **31**:323-330.
- BOSS-WILLIAMS, K.A. y BARTNESS, T.J. (1996). NPY stimulation of food intake in Siberian hamsters is not photoperiod dependent. *Physiol.Behav.* **59**:157-164.
- BOUJARD, T. (1999). Les rythmes circadiens d'alimentation chez Téléostéens. En: *Comptes-rendus des XXIèmes journées de la Société Française d'Ichtyologie*. (Eds.: Boujard, T. y Sire, J.Y.). Cybium, 23 (suppl.). pp. 89-112.
- BOUJARD, T. y LEATHERLAND, F. (1992a). Diel pattern of hepatosomatic index, liver glycogen and lipid content, plasma non-esterified free fatty acids, glucose, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, growth hormone and cortisol concentrations in *Oncorhynchus mykiss* held in different photoperiod regimes and fed using demand-feeders. *Fish Physiol.Biochem.* **10**:111-122.
- BOUJARD, T. y LEATHERLAND, F. (1992b). Circadian rhythms and feeding time in fishes. *Environ.Biol.Fish.* **35**:109-131.
- BOUJARD, T., BRETT, S., LIN, L. y LEATHERLAND, F. (1993). Effect of restricted access to demand feeders on diurnal pattern of liver composition, plasma metabolites and hormone levels in *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol.Biochem.* **11**:337-344.
- BOURET, S.G. y SIMERLY, R.B. (2004). Minireview: leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology* **145**:2621-2626.
- BOWERS, C.Y. (2001). Unnatural growth hormone-releasing peptide begets natural ghrelin. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **86**:1464-1469.
- BRAUGE, C., MEDALE, F. y CORRAZE, G. (1994). Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* **123**:109-120.
- BROGLIO, F., GOTTERO, A., ARVAT, E. y GHIGO, E. (2003). Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. *Horm.Res.* **59**:109-117.
- BROWN, C.M. y COSCINA, D.V. (1995). Ineffectiveness of hypothalamic serotonin to block neuropeptide Y induced feeding. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **51**:641-646.
- BRUNETTI, L., MICHELOTTO, B., ORLANDO, G. y VACCA, M. (1999). Leptin inhibits norepinephrine and dopamine release from rat hypothalamic neuronal endings. *Eur.J.Pharmacol.* **372**:237-240.
- BRUNETTI, L., RECINELLA, L., ORLANDO, G., MICHELOTTO, B., DI NISIO, C. y VACCA, M. (2002). Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus. *Eur.J.Pharmacol.* **454**:189-192.
- BRYLIŃSKA, M. y DŁUGOSZ, M. (1978). Variations of the egg diameter of tench (*Tinca tinca* L.) on the background of annual macro- and microscopic changes occurring in the ovary of mature females. *Rocz Nauk Rol., Ser. H.* **99**: 23-46.
- BUBENIK, G.A., BROWN, G. y GROTA, L. (1977). Immunohistological localization of melatonin in the rat digestive system. *Experientia* **33**:662-63.
- BUIJS, R.M., VAN EDEN, C.G., GONCHARRUK, V.D. y KALSBECK, A. (2003). The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J.Endocrinol.* **177**:17-26.

- CAGAMPANG, F.R.A., YAMAZAKI, S., OTORI, Y. e INOUE, S.I.T. (1993). Serotonin in the raphe nuclei: regulation by light and an endogenous pacemaker. *Neuroreport* **5**:49-52.
- CAHILL, G.M. (1996). Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Res.* **708**:177-181.
- CAHILL, G.M. y BESHARSE, J.C. (1989). Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **86**:1098-1102.
- CAHILL, G.M. y BESHARSE, J.C. (1990). Circadian regulation of melatonin in the retina of *Xenopus laevis*: limitation by serotonin availability. *J.Neurochem.* **54**:716-719.
- CAHILL, G.M. y BESHARSE, J.C. (1993). Circadian clock functions localized in *Xenopus* retinal photoreceptors. *Neuron* **10**:573-577.
- CAHILL, G.M. y BESHARSE, J.C. (1995). Circadian rhythmicity in vertebrates retina: regulation by a photoreceptor oscillator. *Prog.Retinal Eye Res.* **14**:267-291.
- CALAPAI, G., CORICA, F., CORSONELLO, A., SAUTEBIN, L., DI ROSA, M., CAMPO, G.M., BUEMI, M., MAURO, V.N., CAPUTI, A.P. (1999). Leptin increases serotonin turnover by inhibition of brain nitric oxide synthesis. *J.Clin.Invest.* **104**:975-982.
- CANPOLAT, S., SANDAL, S., YILMAZ, B., YASAR, A., KUTLU, S., BAYDAS, G. y KELESTIMUR, H. (2001). Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat. *Eur.J.Pharmacol.* **428**:145-148.
- CAPUANO, C.A., LEIBOWITZ, S.F. y BARR, G.A. (1992). The pharmaco-ontogeny of the paraventricular  $\alpha_2$ -adrenergic receptor system mediating norepinephrine-induced feeding in the rat. *Develop.Brain Res.* **68**:67-74.
- CASSONE, V.M. (1990). Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.* **13**:457-464.
- CASSONI, P., PAPPOTI, M. y GHE, C. (2001). Characterization, identification and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J.Endocrinol.Metab.* **86**:1738-1745.
- CERDÁ-REVERTER, J.M. y LARHAMMAR, D. (2000). Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function, and molecular evolution. *Biochem.Cell Biol.* **78**:371-392.
- CERDÁ-REVERTER, J.M., ZANUY, S., CARRILLO, M. y KAH, O. (1996). Development of enzyme immunoassays for 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and L-thyroxine: time-course studies on the effect of food deprivation on plasma thyroid hormones in two marine teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Gen.Comp.Endocrinol.* **103**:290-300.
- CERDÁ-REVERTER, J.M., ZANUY, S., CARRILLO, M. y MADRID, J.A. (1998). Time-course studies on plasma glucose, insulin, and cortisol in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. *Physiol.Behav.* **64**:245-250.
- CERDÁ-REVERTER, J.M., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G., ZANUY, S., CARRILLO, M. y LARHAMMAR, D. (2000a). Molecular evolution of neuropeptide Y (NPY) family of peptides: cloning of three NPY-related peptides from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Regul.Peptides* **95**:25-34.

- CERDÁ-REVERTER, J.M., ANGLADE, I., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G., MAZURAS, D., MUÑOZ-CUETO, J.A., CARRILLO, M., KAH, O. y ZANUY, S. (2000b). Characterization of neuropeptide Y expression in the brain of a perciform fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J.Chem.Neuroanat.* **19**:199-210.
- CHALLET, E., PEVET, P., VIVIEN-ROELS, B. y MALAN, A. (1997). Phase-advance daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J.Biol.Rhythms* **12**:65-79.
- CHAMORRO, S., DELLA-ZUANA, O., FAUCHÈRE, J.L., FÉLÈTOU, M., GALIZZI, J.P. y LEVENS, N. (2002). Appetite suppression based on selective inhibition of NPY receptors.
- CHANG, J.P., VAN GOOR, F. y ACHARYA, S. (1991). Influences of norepinephrine, and adrenergic agonist on gonadotropin secretion from dispersed pituitary cells of goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* **54**:202-210.
- CHEUNG, R., ANDREWS, P.C., PLISETSKAYA, E.M. y YOUSON, J.H. (1991). Immunoreactivity to peptides belonging to the pancreatic polypeptide family (NPY, aPY, PP, PPY) and to glucagon-like peptide in the endocrine pancreas and anterior intestine of adult lampreys, *Petromyzon marinus*: an immunohistochemical study. *Gen.Comp.Endocrinol.* **81**:51-63.
- CHENG, W., LIGUO, Y., GEN, W. y TAYA, K. (2003). Secretion and regulatory mechanism of leptin during pregnancy in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Chin.Sci.Bull.* **11**:1118-1123.
- CHIBA, A. (1997). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of the bichir, *Polypterus senegalus*, with special regard to the terminal nerve. *Cell.Tissue Res.* **289**:275-284.
- CHIBA, A. (1999). Immunohistological mapping of serotonin-containing neurons in the brain of the Senegal bichir, *Polypterus senegalus* (Brachipoterigii, Osteichthyes). *Zool.Sci.* **16**:395-399.
- CHIBA, A. y HOMNA, Y. (1994). Neuropeptide Y-immunoreactive structures in the telencephalon and diencephalon of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus* whit special regard to the hypothalamo-hypophyseal system. *Arch.Histol.Cytol.* **57**:77-86.
- CHIBA, A. y OKA, S. (1999). Serotonin-immunoreactive structures in the central nervous system of the garfish *Lepisosteus productus* (Semionotiformes, Osteichthyes). *Neurosci.Lett.* **261**:73-76.
- CHICK, C.L., HO, A.K. y BROWN, G.M. (1987). Effect of food restriction on 24-h serum and pineal melatonin content in male rats. *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* **115**:507-513.
- CHILMONCZYK, Z. (1995). Models of 5-hydroxytryptamine receptors. A review. *J.Pharm.Pharmacol.* **47**:791-801.
- CHIQUET, C., DKHIDDI-BENYAHYA, O., COOPER, H.M., CLAUSTRAT, B. y DENIS, P. (2001). Ceil et rythmes circadiens. *J.Fr.Ophtalmol.* **24**:659-671.
- CHO, C.Y. y KAUSHIK, S.J. (1990). Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Rev.Nutr.Diet.* **61**:132-172.

- CHONG, N.W., BERNARD, M. y KLEIN, D.C. (2000). Characterization of the chicken serotonin N-acetyltransferase gene. Activation via clock gene heterodimer/E box interaction. *J.Biol.Chem.* **275**:32991-32998.
- CIFONELLI, J.A., MONTGOMERY, R. y SMITH, F. (1956). The reaction between Concavalin-A and glycogen. *J.Am.Chem.Soc.* **78**:2485-2489.
- CLAIREAUX, G. y LAGARDERE, J.P. (1999). Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of European sea bass. *J.Sea Res.* **42**:157-168.
- CLARKE, I.J., TILBROOK, A.J., TURNER, A.I., DOUGHTON, B.W. y GODING, J.W. (2000). Sex, fat and the tilt of the earth: effects of sex and season on the feeding response to centrally administered leptin in sheep. *Endocrinology* **142**:2725-2728.
- COHEN, S.L., HALAAS, J.L., FRIEDMAN, J.M., CHAIT, B.T., BENNETT, L., CHANG, D., HECHT, R. y COLLINS, F. (1996). Human leptin characterization. *Nature* **382**:589.
- COLLAZOS, M.E., BARRIGA, C. y ORTEGA, E. (1994a). Optimum conditions for the activation of the alternative complement pathway of a cyprinid fish (*Tinca tinca* L.). Seasonal variations in the titres. *Fish Shellfish Immunol.* **4**:499-506.
- COLLAZOS, M.E., ORTEGA, E. y BARRIGA, C. (1994b). Effect of temperature on the immune system of a cyprinid fish (*Tinca tinca*, L.). Blood phagocyte function at low temperature. *Fish Shellfish Immunol.* **4**:231-238.
- COLLAZOS, M.E., BARRIGA, C. y ORTEGA, E. (1994c). Enhanced granulocyte phagocytosis at low winter temperature and high summer temperature in the tench (*Tinca tinca* L.). *Comp.Biochem.Physiol.* **109A**:643-648.
- COLLAZOS, M.E., ORTEGA, E. y BARRIGA, C. (1995a). Influence of the temperature upon the proliferative response of lymphocytes of tench (*Tinca tinca*) during winter and summer. *Comp.Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* **18**:209-214.
- COLLAZOS, M.E., BARRIGA, C. y ORTEGA, E. (1995b). Seasonal variations in the immune system of the cyprinid *Tinca tinca*. Phagocytic function. *Comp.Immun.Microbiol.Infect.Dis.* **18**:105-113.
- COLLAZOS, M.E., BARRIGA, C. y ORTEGA, E. (1995c). Effect of high summer temperatures upon granulocyte phagocytic function of the tench (*Tinca tinca* L.). *Comp.Immun.Microbiol.Infect.Dis.* **18**:115-121.
- COLLAZOS, M.E., BARRIGA, C. y ORTEGA, E. (1996). Seasonal variations in the immune system of the tench, *Tinca tinca* (Cyprinidae): proliferative response of lymphocytes induced by mitogens. *J.Comp.Physiol.* **165B**:592-595.
- COLLAZOS, M.E., ORTEGA, E., BARRIGA, C. y RODRÍGUEZ, B. (1998). Seasonal variation in haematological parameters in male and female tench *Tinca tinca*. *Mol.Cell.Biochem.* **114**:432-435.
- CONLON, J.M. (2002). The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides* **23**:269-278.
- CONSIDINE, R.V. (2001). Regulation of leptin production. *Rev.Endocrinol.Metab.Disord.* **2**:357-363.

- COON, S.L., BÉGAY, V., FALCÓN, J., y KLEIN, D.C. (1998). Expression of melatonin synthesis genes is controlled by a circadian clock in the pike pineal organ but not in the trout. *Biol.Cell.* **90**:399-405.
- COON, S.L., BÉGAY, V., DEURLOO, D., FALCÓN, J. y KLEIN, D.C. (1999). Two arylalkylamine N-acetyltransferase genes mediate melatonin synthesis in fish. *J.Biol.Chem.* **274**:9076-9082.
- CORIO, M., PEUTE, J. y STEINBUSCH, H.W.M. (1991). Distribution of serotonin- and dopamine immunoreactivity in the brain of the teleost *Clarias gariepinus*. *J.Chem.Neuroanat.* **4**:79-95.
- COSTENTIN, J. (2003). Physiological and neurobiological aspects of eating. *Bull.Acad.Natl.Med.* **187**: 1367-1376.
- COWLEY, M.A., SMITH, R.G., DIANO, S., TSCHÖP, M., PRONCHUK, N., GROVE, K.L., STRASBURGER, C.J., BIDLINGMAIER, M., ESTERMAN, M., HEIMAN, M.L., GARCÍA-SEGURA, L.M., NILLNI, E.A., MÉNDEZ, P., LOW, M.J., SOTONYI, P., FRIEDMAN, J.M., LIU, H., PINTO, S., COLMERS, W.F., CONE, R.D. y HORVATH, T.L. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**:649-661.
- CRISCUOLO, M., DE GAETANI, C., FICARRA, G., NAPPI, R.E., MIGALDI, M., PETRAGLIA, F., GENAZZANI, A.R. y TRENTINI, G.P. (1994). Ontogeny of the circadian rhythm in medial basal hypothalamic  $\beta$ -endorphin content in female rat. *J.Endocrinol.Invest.* **17**:697-701.
- CUADRADO, M.I., COVEÑAS, R. y TRAMU, G. (1993). Neuropeptides and monoamines in the carp (*Cyprinus carpio*) pretectum: an immunocytochemical study. *Tissue Cell.* **25**:549-561.
- CUMMINGS, D.E. y SHANNON, M.H. (2003) Ghrelin and gastric bypass: is there a hormonal contribution to surgical weight loss. *J.Clin Endocrinol.Metab.* **88**:2999-3002.
- CUMMINGS, D.E., PURNELL, J.Q., FRAYO, R.S., SCHMIDOVA, K., WISSE, B.E. y WEIGLE, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggest a role in meal initiation in humans. *Diabetes* **50**:1714-1719.
- CUMMINGS, D.E., WEIGLE, D.S., FRAYO, R.S., BREEN, P.A., MA, M.K., DELLINGER, P. y PURNELL, J.Q. (2002). Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N.Engl.J.Med.* **346**:1623-1630.
- CURRIE, P.J. y WILSON, L.M. (1992). Yohimbine attenuates clonidine-induced feeding and macronutrient selection in genetically obese (ob/ob) mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **43**:1039-1046.
- CURRIE, P.J. y COSCINA, D.V. (1998). 5-Hydroxytryptaminergic receptor agonist: effects on neuropeptide Y potentiation on feeding and respiratory quotient. *Brain Res.* **803**:212-217.
- CYPHER, B.L. y FROST, N. (1999). Condition of San Joaquin kit foxes in urban and exurban habitats. *J.Wild.Manag.* **63**:930-938.
- DAGNAULT, A., DESHASIES, Y. y RICHARD, D. (1993). Effects of the 5-hydroxytryptamine agonist D,L-fenfluramine on the energy balance in rats: influence of gender. *Int.J.Obesity* **17**:367-373.

- DANGER, J.M., BRETON, B., VALLARINO, M., FOURNIER, A., PELLETIER, G. y VAUDRY, H. (1991). Neuropeptide Y in the trout brain and pituitary: localization, characterization, and action on gonadotropin release. *Endocrinology* **128**:2360-2368.
- DANNEVIG, B.H. y NORUM, K.R. (1982). Cholesterol sterification and lipids in blood plasma of charr (*Salmo alpinus* L.) during sexual maturation. *Comp.Biochem.Physiol.* **73B**:771-777.
- DARROW, J.M., TAMARKIN, L., DUNCAN, M.J. y GOLDMAN, B.D. (1986). Pineal melatonin rhythms in female turkish hamsters: effects of photoperiod and hibernation. *Biol.Reprod.* **35**:74-83.
- DATE, Y., MURAKAMI, N., TOSHINAI, K., MATSUKURA, S., NIJIMA, A., MATSUO, H., KANGAWA, K. y NAKAZATO, M. (2002). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* **123**:1120-1128.
- DAVIES, B., HANNAH, L.T., RANDALL, C.F., BROMAGE, N. y WILLIAMS, L.M. (1994). Central melatonin binding sites in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Gen.Comp.Endocrinol.* **96**:19-26.
- DE LA HIGUERA, M. y CÁRDENAS, P. (1984). Influence of dietary composition on gluconeogenesis from L-(U-<sup>14</sup>C) glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdner*). *Comp.Biochem.Physiol.* **81A**:391-395.
- DE PEDRO, N. y BJÖRNSSON, T. (2001). Regulation of food intake by neuropeptides and hormones. En: *Food intake in fish*. (Eds.: Houlihan, D., Boujard, T. y Jobling, M.). Blackwell Science Ltd., Oxford. pp. 267-296.
- DE PEDRO, N., CÉSPEDES, M.V., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (1995). The galanin-induced feeding stimulation is mediated via  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in goldfish. *Regul.Peptides* **57**:77-84.
- DE PEDRO, N., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (1998a). Alpha1-adrenergic and dopaminergic receptors are involved in the anorectic effect of corticotropin-releasing factor in goldfish. *Life Sci.* **62**:1801-1808.
- DE PEDRO, N., DELGADO, M.J., PINILLOS, M.L., ALONSO-GÓMEZ, A.L. y ALONSO-BEDATE, M. (1998b). Daily rhythms in NAT activity, cortisol, glucose, glycogen and catecholamines in tench (*Tinca tinca* L.). *Polisk. Arch.Hydrobiol.* **45**:321-329.
- DE PEDRO, N., PINILLOS, M.L., VALENCIANO, A.I., ALONSO-BEDATE, M. y DELGADO, M.J. (1998c). Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: involvement of CRF. *Peptides* **19**:505-511.
- DE PEDRO, N., LÓPEZ-PATIÑO, M.A., GUIJARRO, A.I., PINILLOS, M.L., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (2000). NPY receptors and opioidergic system are involved in NPY-induced feeding in goldfish. *Peptides* **21**:1495-1502.
- DE PEDRO, N., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (2001a). Fasting and hypothalamic catecholamines in goldfish. *J.Fish Biol.* **58**:1404-1413.
- DE PEDRO, N., GUIJARRO, A.I., DELGADO, M.J., LÓPEZ-PATIÑO, M.A., PINILLOS, M.L. y ALONSO-BEDATE, M. (2001b). Influence of dietary composition on growth and energy reserves in tench (*Tinca tinca*). *J.Appl.Ichtiol.* **17**:25-29.



- DE PEDRO, N., DELGADO, M.J., GANCEDO, B. y ALONSO-BEDATE, M. (2003). Changes in glucose, glycogen, thyroid activity and hypothalamic catecholamines in tench by starvation and refeeding. *J.Comp.Physiol.* **173**:475-481.
- DE PEDRO, N., MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R., GUIJARRO, A.I., LÓPEZ-PATÍÑO, M.A., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (2004). Leptin induced changes in body weight and composition in goldfish. 5<sup>th</sup> International Symposium on Fish Endocrinology. September, 5-9, 2004.
- DEARRY, A. y BARLOW, R.B. (1987). Circadian rhythms in the sunfish retina. *J.Gen.Physiol.* **89**:745-770.
- DELAHUNTY, G., OLCESE, J., PRACK, M., VODICNIK, M.J., SCHRECK, C.B. y VLAMING, V. (1978). Diurnal variations in the physiology of the goldfish *Carassius auratus*. *J.Interdisc.Cycle Res.* **9**:73-88.
- DELGADO, M.J. y VIVIEN-ROELS, B. (1989). Effect of environmental temperature and fotoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye and plasma of the frog, *Rana perezi*: importance of ocular melatonin. *Gen.Comp.Endocrinol.* **75**:46-53.
- DELGADO, M.J., ALONSO-GÓMEZ, A.L., GANCEDO, B., DE PEDRO, N., VALENCIANO, A.I. y ALONSO-BEDATE, M. (1993). Serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity and melatonin levels in the frog retina are not correlated during seasonal cycle. *Gen.Comp.Endocrinol.* **92**:143-150.
- DOBBINS, A., LUBBERS, L.S., JACKSON, G.L., KUEHL, D.E. y HILEMAN, S.M. (2004). Neuropeptide Y gene expression in male sheep: influence of photoperiod and testosterone. *Neuroendocrinology.* **79**:82-89.
- DOU, S.Z. y TSUKAMOTO, K. (2003). Observations on the nocturnal activity and feeding behavior of *Anguilla japonica* glass eels under laboratory conditions. *Environ.Biol.Fish.* **67**:389-395.
- DOYON, C., DROUIN, G., TRUDEAU, V.R. y MOON, T.W. (2001). Molecular evolution of leptin. *Gen.Comp.Endocrinol.* **124**:188-198.
- DRAZEN, D.L., KRIEGSFELD, L.J., SCHNEIDER, J.E. y NELSON, R.J. (2000). Leptin, but not immune function, is linked to reproductive responsiveness to photoperiod. *Am.J.Physiol.* **278**:R1401-R1407.
- DRUMHELLER, A., BOUALI, S.M., FOURNIER, A., ST-PIERRE, S. y JOLICOUER, F.B. (1994). Neurochemical effects of neuropeptide Y (NPY) and NPY<sup>2-36</sup>. *Neuropeptides* **27**:291-296.
- DRYDEN, S., MCCARTHY, H.D., MALABU, U.H., WARE, M. y WILLIAMS, G. (1993). Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic nuclei of the rat following treatment with methysergide: evidence that NPY may mediate serotonin's effects on food intake. *Peptides* **14**:791-796.
- DUBOCOVICH, M.L. y TAKAHASHI, J.S. (1987). Use of 2[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **84**:3916-3920.
- DUBOCOVICH, M.L., CARDINALI, D.P., DELAGRANGE, P., KRAUSE, D.N., STROSBURG, A.D., SUDGEN, D. y Yocca, F.D. (2002). The compendium of receptor characterization and clasiffication. IUPHAR Media, London. pp. 187-193

- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. y SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**:350-356.
- DUGGLEBY, R.G. (1981). A non linear regression program for small computers. *Anal.Biochem.* **110**:9-18.
- DZAJA, A., DALAL, M.A., HIMMERICH, H., UHR, M., POLLMÄCHER, T. y SCHULD, A. (2004). Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* **286**:E963-E967
- ECHEVERRÍA, G., MARTÍNEZ-BEBIÁ, M. y ZAMORA, S. (1997). Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comp.Biochem.Physiol.* **118A**:111-123.
- EDSALL, C.C. (1999). A blood chemistry profile for lake trout. *J.Aq.Anim.Health* **11**:81-86.
- EKSTRÖM, P. y MEISSEL, H. (1989). Signal processing in a simple vertebrate photoreceptor system: the pineal organ. *Physiol.Biochem.* **38**: 311-332.
- EKSTRÖM, P. y MEISSEL, H. (1997). The pineal organ of teleost fishes. *Rev.Fish Biol.Fisheries.* **7**:199-284.
- EKSTRÖM, P. y VANEČEK, J. (1992). Localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Neuroendocrinology* **55**:529-537.
- ELLIS, A.E. (1989). The immunology of teleosts. En: *Fish pathology*. (Ed.: Roberts, R.J.). pp. 135-152.
- ERIKSSON, L.O. (1978). Nocturnalism versus diurnalism; dualism within fish individuals. En: *Rhythmic Activity of Fishes*. (Ed.:Thorpe, J.E). Academic Press, London. pp. 69-90.
- ESA, INC. (1992). Coulochem II, operating manual, Bedford pp. 5.1-5.27.
- ESCOBAR, C., MARTÍNEZ-MERLOS, M.T., ÁNGELES, M. y MENDOZA, J.Y. (2001). El alimento como sincronizador de los ritmos biológicos: su relevancia para la identificación de un oscilador circadiano. *Rev.Fac.Med.* **44**:58-62.
- FALCÓN, J. (1999). Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog.Neurobiol.* **58**:121-162.
- FALCÓN, J. y COLLIN, J.P. (1989). Photoreceptors in the pineal of lower vertebrates: functional aspects. *Experientia* **45**:909-913.
- FALCÓN, J., GUERLOTTÉ, J.F., VOISIN, P. y COLLIN, J.-P.H. (1987). Rhythmic melatonin biosynthesis in a photoreceptive pineal organ: a study in the pike. *Neuroendocrinology* **45**:479-486.
- FALCÓN, J., BRUN-MARMILLON, B., CLAUSTRAT, B. y COLLIN, J.P. (1989). Regulation of melatonin secretion in a photoreceptive pineal organ: an *in vitro* study in the pike. *J.Neurosci.* **9**:1943-1950.
- FALCÓN, J., THIBAULT, C., BÉGAY, V., ZACHMANN, A. y COLLIN, J.P. (1992). Regulation of the rhythmic melatonin secretion by fish pineal photoreceptor cells. En: *Rhythms in fishes*. (Ed.: Ali, M.A.). Plenum Press, New York. pp. 167-198.
- FALCÓN, J., BOLLIET, V., RAVAUULT, J.P., CHESNEAU, D., ALI, M.A. y COLLIN, J.P. (1994). Rhythmic secretion of melatonin by the superfused pike pineal organ: thermo- and photoperiod interaction. *Neuroendocrinology* **60**:535-543.

- FALCÓN, J., MOLINA-BORJA, M., COLLIN, J.-P. y OAKNIK, S. (1996). Age-related changes in 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding sites in the brain of sea bass breams (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.* **15**:401-411.
- FALCÓN, J., GOTHILF, Y., COON, S.L., BOEUF, G. y KLEIN, D.C. (2003). Genetic, temporal and developmental differences between melatonin rhythm generating systems in the teleost fish pineal organ and retina. *J. Neuroendocrinol.* **15**:378-82.
- FAUCONNEAU, B. (1985). Protein synthesis and protein deposition in fish. En : *Nutrition and feeding in fish*. (Eds.: Cowey, C.B., Mackie, A.M. y Bell, J.G.). Academic Press, London. pp.17-45.
- FELDMAN, R.S., MEYER, J.S. y QUENZER, L.F. (1997). Serotonin. En: *Principles of neuropsychopharmacology*. (ED.: Sunderland, MA). Sinauer Associates. pp. 345-389.
- FERNÁNDEZ, E.P. (1999). Caracterización de la hidroxindol-O-metiltransferasa en la retina de *Rana perezi*: mecanismo catalítico y regulación diaria. Tesis de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.
- FERNSTROM, J.D. y FERNSTROM, M-H. (1994). Dietary effects on tyrosine availability and catecholamine synthesis in the central nervous system: possible relevance to the control of protein intake. *Proc.Nutr.Soc.* **53**:419-429.
- FERRARO, J.S. y STEGER, R.W. (1990). Diurnal variations in brain serotonin are driven by photic cycle and are no circadian in nature. *Brain Res.* **512**:121-124.
- FIRTH, B.T., THOMPSON, M.B., KENNAWAY, D.J. y BELAN, I. (1989). Thermal sensitivity of reptilian melatonin rhythms: "cold" tuatara vs. "warm" skin. *Am.J.Physiol.* **256**:R1160-R1163.
- FLEIG, R. y GOTTSCHALK, T. (2001). Schleim im karpfenteich. *Fischer & Teichwirt* **52**:129-131.
- FLORANT, G.L., RIVERA, M.L., LAWRENCE, A.K. y TAMARKIN, L. (1984). Plasma melatonin concentrations in hibernating marmots: absence of a plasma melatonin rhythm. *Am.J.Physiol.* **247**:R1062-R1066.
- FOLCH, J., LEES, M. y STANLEY, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J.Biol.Chem.* **226**:497-509.
- FOLLET, B.K., FOSTER, R.G. y NICHOLLS, T.D. (1985). Photoperiodism in birds. En: *Photoperiodism. Melatonin and the pineal*. Ciba Foundaton Symposium. Pitman, London. pp. 93-105.
- FOSTER, G.D. y MOON, T.W. (1991). Hypometabolism with fasting in the yellow perch (*Perca flavescens*). A study of enzymes, hepatocyte metabolism, and tissue size. *Physiol.Zool.* **64**:259-275.
- FOSTER, R.G., GARCÍA-FERNÁNDEZ, J.M., PROVENCIO, I. y DEGRIP, W.J. (1993a). Opsin localization and chromophore retinoids identified within the basal brain of the lizard *Anolis carolinensis*. *J.Comp.Physiol.* **172(A)**:33-45.
- FOSTER, A.R., HOULIHAN, D.F. y HALL, S.J. (1993b). Effects of nutritional regime on correlates of growth rate in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*): comparison of morphological and biochemical measurements. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* **50**:502-512.
- FRANGIONI, G., BERTI, R. y BORGIOLI, G. (1997). Hepatic respiratory compensation and haematological changes in the cave cyprinid, *Phreatichthys andruzzii*. *J.Comp.Physiol.* **167B**:461-467.

- FRANKLIN, C.E. (1993). The role of the spleen during exercise in the Antarctic teleost, *Pagothenia borchgrevinki*. *J.Exp.Biol.* **174**:381-386.
- FRASER, N.H.C. y METCALFE, N.B. (1997). The cost of the becoming nocturnal: feeding efficiency in relation to light intensity in juvenile Atlantic salmon. *Funct.Ecol.* **11**:760-767.
- FRASER, N.H.C., METCALFE, N.B. y THORPE, J.E. (1993). Temperature dependent switch between diurnal and nocturnal foraging in salmon. *Proc.Royal Soc.London B* **252**:135-139.
- FRASER, N.H.C., HEGGENES, J., METCALFE, N.B. y THORPE, J.E. (1995). Low summer temperature cause juvenile Atlantic salmon to become nocturnal. *Can.J.Zool.* **73**:446-451.
- FREDRIKSSON, R., LARSON, E.T., YAN, Y.L., POSTLETHWAIT, J.H. y LARHAMMAR, D. (2004). Novel neuropeptide Y Y2-like receptor in zebrafish supports early vertebrate chromosome duplications. *J.Mol.Evol.* **58**:106-114.
- FUGLEI, E., MUSTONEN, A.M. y NIEMINEN, P. (2004). Effects of season, food deprivation and re-feeding on leptin, ghrelin and growth hormone in arctic foxes (*Alopex lagopus*) on Svalbard, Norway. *J.Comp.Physiol.* **174B**:157-162.
- FULLER, R.W. (1985). Drugs altering serotonin synthesis and metabolism. En: *Neuropharmacology of serotonin*. (Ed.: Green, A.R.). Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 1-20.
- FURUTA, M., FUNABASHI, T. y KIMURA, F. (2001). Intracerebroventricular injection of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **288**:780-785.
- GAIKWARD, A., BIJU, K.C., SAHA, S.G. y SUBHEDAR, N. (2004). Neuropeptide Y in the olfactory system, forebrain and pituitary of the teleost, *Clarias batrachus*. *J.Chem.Neuroanat.* **27**:55-70.
- GAILDRAT P. y FALCÓN J. (1999). Expression of melatonin receptors and 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the pituitary of a teleost fish. *Adv. Exp. Med. Biol.* **460**:61-72.
- GAILDRAT, P., RON, B. y FALCÓN, J. (1998). Daily and circadian variations in 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding sites in the pike brain (*Exos lucius*). *J.Neuroendocrinol.* **10**:511-517.
- GAILDRAT, P., BECQ, F. y FALCÓN, J. (2002). First cloning and functional characterization of a melatonin receptor in fish brain: a novel one? *J.Pineal Res.* **32**:74-84.
- GALLAUGHER, P. y FARRELL, A.P. (1998). Hematocrit and blood oxygen-carrying capacity. En: *Fish respiration*. (Eds.: Perry, S.F. y Tufts, B.L.). Academic Press, New York. pp. 185-222.
- GARCÍA-ALLEGUE, R., MADRID, J.A. y SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2001). Melatonin rhythms in European sea bass plasma and eye: influence of seasonal photoperiod and water temperature. *J.Pineal. Res.* **31**: 68-75.
- GARCÍA DE FRUTOS, P., BONAMUSA, L. y BAANANTE, I.V. (1991). Metabolic changes in fish liver during the starved-to-fed transition. *Comp.Biochem.Physiol.* **98A**:329-331.
- GARCÍA DE MARINA, A. y DEL CASTILLO, B. (1988). Cromatografía líquida de alta resolución. Editorial Limusa, Méjico.
- GAUER, F., MASSON-PÉVET, M., SKENE, D.J., VIVIEN-ROELS, B. y PÉVET, P. (1993). Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology* **57**:120-126.

- GERN, W.A. y GREENHOUSE, S.S. (1988). Examination of *in vitro* melatonin secretion from superfused trout (*Salmo gairdneri*) pineal organs maintained under diel illumination or continuous darkness. *Gen.Comp.Endocrinol.* **71**:163-174.
- GERN, W.A., OWENS, D.W. y RALPH, C.L. (1978). Persistence of the nycthemeral rhythm of melatonin secretion in pinealectomized or optic-tract sectioned trout (*Salmo gairdneri*). *J.Exp.Zool.* **205**:371-376.
- GERN, W.A., NORRIS, D.O. y DUVALL, D. (1983). The effect of light and temperature on plasma melatonin in neotenic tiger salamanders (*Ambystoma trigrinum*). *J.Herpetol.* **3**:228-234.
- GERN, W.A., WECHSLER, E. y DUVALL, D. (1984). Characteristics and non-rhythmicity of retinal hydroxyindol-O-methyltransferase activity in trout (*Salmo gairdneri*). *Gen.Comp.Physiol.* **53**:169-178.
- GERN, W.A., GREENHOUSE, S.S., NERVINA, J.M. y GASSER, P.J. (1992). The rainbow trout pineal organ: an endocrine photometer. En: *Rhythms in fishes*. (Ed.: Ali, M.A.). Plenum Press, New York. pp. 199-218.
- GHIGO, E., ARVAT, E., GIORDANO, R., BROGLIO, F., GIANOTTI, L., MACCARIO, M., BISI, G., GRAZIANI, A., PAPOTTI, M., MUCCIOLI, G., DEGHENGI, R. y CAMANNI, F. (2001). Biological activities of growth hormone secretagogues in humans. *Endocrine* **14**:87-93.
- GIBBS, F.P. y VRIEND, J. (1981). The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* **109**:1796-1798.
- GIBSON, E.L., KENNEDY, A.J. y CURZON, G. (1993). d-Fenfluramine- and d-norfenfluramine-induced hypophagia: differential mechanism and involvement of postsynaptic 5-HT receptors. *Eur.J.Pharmacol.* **242**:83-90.
- GILCHRIST, B.J., TIPPING, D.R., LEVY, A. y BAKER, B.I. (1998). Diurnal changes in the expression of genes encoding for arginine vasotocin and pituitary pro-opiomelanocortin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): correlation with changes in plasma hormones. *J.Neuroendocrinol.* **10**:937-943.
- GILLARD, E.R., DANG, D.Q. y STANLEY, B.G. (1993). Evidence that neuropeptide Y and dopamine in the perifornical hypothalamus interact antagonistically in the control of food intake. *Brain Res.* **628**:128-136.
- GLAUM, S.R., HARA, M., BINDOKAS, V.P., LEE, C.C., POLONSKY, K.S., BELL, G.I. y MILLER, R.J. (1996). Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus. *Mol.Pharmacol.* **50**:230-235.
- GNANAPAVAN, S., KOLA, B., BUSTIN, S.A., MORRIS, D.G., MCGEE, P., FAIRCLOUGH, P., BHATTACHARYA, S., CARPENTER, R., GROSSMAN A.B. y KORBONITS, M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **87**:2988-2991.
- GÓMEZ-JARABO, G. (Ed.) (1997). *Farmacología de la conducta: manual básico para psicoterapeutas y clínicos*. Editorial Síntesis, S.A., Madrid.

- GOOS, H.J., DE LEEUW, R., DE ZOETEN-KAMP, C., PEUTE, J. y BLÄHSE, S. (1985). Gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neuronal structures in the brain and pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Cell.Tissue Res.* **241**:595-596.
- GRACE, M.S., CAHILL, G.M. y BESHARSE, J.C. (1989). Arylacetylamide in ocular melatonin metabolism: distribution among vertebrate classes. *Invest.Ophthalmol.Visual Sci.Suppl.* **30**:123.
- GREENWOOD, M.F.D. y METCALFE, N.B. (1998). Minnows become nocturnal at low temperatures. *J.Fish Biol.* **53**:25-32.
- GRIGNASCHI, G. y SAMANIN, R. (1992). Role of 5-HT receptors in the effect of d-fenfluramine on feeding patterns in the rat. *Eur.J.Pharmacol.* **212**:287-289.
- GRILL, H.J. y KAPLAN, J.M. (2002). The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front Neuroendocrinol.* **23**:2-40.
- GRUNDY, S.M. y DENKE, M.A. (1990). Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J.Lipid Res.* **31**:1149-1172.
- GUALILLO, O., CAMINOS, J.E., KOJIMA, M., KANGAWA, K., ARVAT, E., GHIGO, E., CASANUEVA, F.F. y DIÉGUEZ, C. (2001). Gender and gonadal influences on ghrelin mRNA levels in rat stomach. *Eur.J.Endocrinol.* **144**:687-690.
- GUAN, X.M., YU, H., PALYHA, O.C., MCKEE, K.K., FEIGHNER, S.D., SIRINATHSINGHI, D.J., SMITH, R.G., VAN DER PLOEG, L.H.T. y HOWARD, A.D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **48**:23-29.
- GUERRERO, H.Y., CÁCERES, G., PAIVA, C.L. y MARCANO, D. (1990). Hypothalamic and telencephalic catecholamine content in the brain of the teleost fish, *Pygocentrus natus*, during the annual reproductive cycle. *Gen.Comp.Endocrinol.* **80**:257-263.
- GUIJARRO, A.I., DELGADO, M.J., PINILLOS, M.L., LÓPEZ-PATIÑO, M.A., ALONSO-BEDATE, M. y DE PEDRO, N. (1999). Galanin and  $\beta$ -endorphin as feeding regulators in cyprinids: effect of temperature. *Aquacult.Res.* **30**:483-489.
- GUIJARRO, A.I., LÓPEZ-PATIÑO, M.A., PINILLOS, M.L., ISORNA, E., DE PEDRO, N., ALONSO-GÓMEZ, A.L. y DELGADO, M.J. (2003). Seasonal changes in haematology and metabolic resources in the tench. *J.Fish.Biol.* **62**:803-815.
- GÜNDÜZ, B. (2002). Daily rhythm in serum melatonin and leptin levels in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Comp.Biochem.Physiol.* **132A**:393-401.
- GUTIÉRREZ, J., PÉREZ, J., NAVARRO, I., ZANUY, S. y CARRILLO, M. (1991). Changes in plasma glucagon and insulin associated with fasting in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiol.Biochem.* **9**:107-112.
- GWINNER, E. y HAU, M. (2000). The pineal gland, circadian rhythms, and photoperiodism. En: *Sturkie's avian physiology*. (Ed.: Whittew, G.C.). Academic Press, New York. pp. 557-568.
- HAGEMANN, L.F., COSTA, C.V., ZENI, L.Z.R., FREITAS, C.G., MARINO-NIETO, J. y PASCHOALINI, M.A. (1998). Food intake after adrenaline and noradrenaline injections into the hypothalamic paraventricular nucleus in pigeons. *Physiol.Behav.* **64**:645-652.

- HAJNAL, A. y LÉNÁRD, L. (1997). Feeding related dopamine in the amygdala of freely moving rats. *Neuroreport* **64**:645-652.
- HAKANSSON, M.L., BROWN, H., GHILARDI, N., SKODA, R.C. y MEISTER, B. (1998). Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J.Neurosci.* **18**:559-572.
- HAQUE, R., CHAURASIA, S.S., WESSEL, J.H.3RD e IUVONE, P.M. (2002). Dual regulation of cryptochrome 1 mRNA expression in chicken retina by light and circadian oscillators. *Neuroreport* **13**:2247-2251.
- HARMON, J.S. y SHERIDAN, M.A. (1992). Effects of nutritional state, insulin and glucagon on lipid mobilization in rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **87**:214-221.
- HARRIS, R.B.S., ZHOU, J., REDMANN, S.M.JR., SMAGIN, G.N., SMITH, S.R., ROGERS, E. y ZACHWIEJA, J.J. (1998). A leptin dose-response study in obese (*ob/ob*) and lean (+/?) mice. *Endocrinology* **139**:8-19.
- HASTINGS, J.A., WIESNER, G., LAMBERT, G., MORRIS, M.J., HEAD, G. y ESLER, M. (2002). Influence of leptin on neurotransmitter overflow from the rat brain in vitro. *Regul.Pept.* **103**:67-74.
- HAYASHIDA, T., NAKAHARA, K., MONDAL, M.S., DATE, Y., NAKAZATO, M., KOJIMA, M., KANGAWA, K. y MURAKAMI, N. (2002). Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J.Endocrinol.* **173**:239-245.
- HEGGENES, J., KROG, O.M.W., LINDÁS, O.R., DOKK, J.G. y BREMNES, T. (1993). Homeostatic behavioural responses in a changing environment: Brown trout (*Salmo trutta*) become nocturnal during winter. *J.Animal Ecol.* **62**:295-308.
- HEISLER, L.K., COWLEY, M.A., KISHI, T., TECOTT, L.H., FAN, W., LOW, M.J., SMART, J.L., RUBINSTEIN, M., TATRO, J.B., ZIGMAN, J.M., CONE, R.D. y ELMQUIST, J.K. (2003). Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **994**:167-174.
- HEMING, T.A. y PALECZNY, E.J. (1989). Compositional changes in skin mucus and blood serum during starvation of trout. *Aquaculture* **66**:265-273.
- HEMRE, G.I. y SANDNESS, K. (1999). Effect of dietary lipid level on muscle composition in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquacult.Nutr.* **5**:9-16.
- HEMRE, G.I., KARLSEN, O., LEHMAN, G., HOLM, J.C. y LIE, O. (1993). Utilization of protein, fat and glycogen in cod (*Gadus morhua*) during starvation. *Fiskeridir.Skr.Ernaering.* **6**:1-9.
- HEMRE, G.I., MOMMSEN, T.P. y KROGDAHL, Å. (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult.Nutr.* **8**:175-194.
- HENDERSON, R.J. y TOCHER, D.R. (1987). The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog.Lipid.Res.* **26**:281-347.
- HERNÁNDEZ-RAUDA, R. y ALDEGUNDE, M. (2002). Changes in dopamine, norepinephrine and serotonin levels in the pituitary, telencephalon and hypothalamus during gonadal development of male *Lutjanus argentiventris* (Teleostei). *Mar.Biol.* **141**:209-216.
- HERRERO, M.J., MADRID, J.A. y SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2003). Entrainment to light of circadian activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). *Chronobiol.Int.* **20**:1001-1017.

- HIGGINGS, P.J. y TALBOT, C. (1985). Growth and feeding in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). En: *Nutrition and feeding in fish*. (Eds.: Cowey, C.B., Mackie, A.M. y Bell, J.C.). Academic Press, London. pp. 243-263.
- HOFFER, R., STOLL, M., ROMANI, N., KOCH, F. y SORDYL, H. (2000). Seasonal changes in blood cells of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) from a high mountain lake. *Aquat.Sci.* **62**:308-319.
- HOLLOWAY, A.C., REDDY, P.K., SHERIDAN, M.A. y LEATHERLAND, J.F. (1994). Diurnal rhythms of plasma growth hormone, somatostatin, thyroid hormones, cortisol and glucose concentration in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during progressive food deprivation. *Biol.Rhythm.Res.* **25**:415-432.
- HORVATH, L., TAMAS, G. y TÖLG, I. (1984). Special methods in pond fish husbandry. Halver Corporation. Seattle.
- HORVATH, T.L., DIANO, S., SOTONYI, P., HEIMAN, M. y TSCHÖP, M. (2001). Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance-a hypothalamic perspective. *Endocrinology* **142**:4163-4169.
- HORVATH, T.L., CASTAÑEDA, T., TANG-CHRISTENSEN, M., PAGOTTO, U. y TSCHÖP, M. (2003). Ghrelin as a potential anti-obesity target. *Curr.Pharm.Des.* **9**:1383-1395.
- HOULIHAN, D.F. y LAURENT, P. (1987). Effects of exercise training on the performance, growth and protein turnover of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* **45**:951-964.
- HOUSTON, A.H., DOBRIC, N., y KAHURANANGA, R. (1996). The nature of hematological response in fish. Studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to simulated winter, spring and summer conditions. *Fish Physiol.Biochem.* **15**:339-347.
- HOWARD, A.D., FEIGNER, S.D., CULY, D.F., ARENA, J.P., LIBERATOR, P.A., ROSENBLUM, C.I., HAMELIN, M., HRENIUK, D.L., PALLYA, O.C., ANDERSON, J., PRESS, P.S., DÍAZ, C., CHOU, M., LIU, K.K., MCKEE, K.K., PONG, S.S., CHAUNG, L.Y., ELBRECHT, A., DASHKEVICZ, M., HEAVENS, R., RIGBY, M., SIRINATHSINGHI, D.J.S., DEAN, D.C., MELILLO, D.G., PATCHETT, A.A., NARGUND, R., GRIFFIN, P.R., DEMARTINO, J.A., GUPTA, S., SCHAEFFER, J.M., SMITH, R.G. y VAN DER PLOEG, L.H.T. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* **273**:974-977.
- HOYER, D. y MARTIN, G.R. (1996). 5-HT receptor classification and nomenclature: Towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology* **36**:419-428.
- HUNSICKER, K.D., MULLEN, B.A. y MARTIN, R. (1992). Effect of starvation or restriction on self-selection of macronutrients in rats. *Physiol.Behav.* **51**:325-330.
- HUTCHINGS, J.A., PICKLE, A., MCGREGOR-SHAW, C.R. y POIRIER, L. (1999). Influence of sex, body size, and reproduction on overwinter lipid depletion in brook trout. *J.Fish Biol.* **55**:1020-1028.
- HRUBEC, T.C., ROBERTSON, J.L. y SMITH, S.A. (1997). Effects of temperature on hematologic and serum biochemical profiles of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Am.J.Vet.Res.* **58**:126-130.
- IASON, G.R. y EBLING, J.P. (1989). Seasonal variation in the daily pattern of the plasma melatonin in a wild mammal: the mountain hare (*Lepus timidus*). *J.Pineal Res.* **6**:157-167.
- IIGO, M. y AIDA, K. (1995). Effects of season, temperature, and photoperiod on plasma melatonin rhythm in the goldfish *Carassius auratus*. *J.Pineal Res.* **18**:62-68.



- IGO, M., KEZUKA, H., AIDA, K. y HANYU, I. (1991). Circadian rhythms of melatonin secretion from superfused goldfish (*Carassius auratus*) pineal glands *in vitro*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **83**:152-158.
- IGO, M., KOBAYASHI, M., OHTANI-KANEKO, R., HARA, M., HATTORI, A., SUZUKI, T. y AIDA, K. (1994a). Characteristics, day-night changes, subcellular distribution and localization of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Brain Res.* **644**:231-220.
- IGO, M., KEZUKA, H., SUZUKI, T., TABATA, M. y AIDA, K. (1994b). Melatonin signal transduction in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **18**:563-569.
- IGO, M., FURUKAWA, K., HATTORI, A., HARA, M., OHTANI-KANEKO, R., SUZUKI, T., TABATA, M. y AIDA, K. (1995). Effect of pinealectomy and constant light exposure on day-night changes of melatonin-binding sites in the goldfish brain. *Neurosci.Lett.* **197**:61-64.
- IGO, M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., HARA, M., OHTANI-KANEKO, R., HIRATA, K., SHINOHARA, H., TABATA, M. y AIDA, K. (1997a). Characterization, guanosine 5'-O-3(thiotriphosphate) modulation, daily variation, and localization of melatonin-binding sites in the catfish (*Silurus asotus*) brain. *Gen.Comp.Endocrinol.* **108**:45-55.
- IGO, M., HARA, M., OHTANI-KANEKO, R., HIRATA, K., TABATA, M. y AIDA, K. (1997b). Photic and circadian regulations of melatonin rhythms in fishes. *Biol.Signals* **6**:225-232.
- IGO, M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID, J.A., ZAMORA, S. y TABATA, M. (1997c). Unusual responses to light and darkness of ocular melatonin in European sea bass. *Neuroreport* **8**:1631-1635.
- IGO, M., SATO, M., IKEDA, E., KAWASAKI, S., NOGUCHI, F. y NISHI, G. (2003a). Effects of photic environment on ocular melatonin contents in a labrid teleost, the wrasse *Halichoeres tenuispinnis*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **133**:252-259.
- IGO, M., MIZUSAWA, K., YOKOSUKA, M., HARA, M., OHTANI-KANEKO, R., TABATA, M., AIDA, K. e HIRATA, K. (2003b). *In vitro* photic entrainment of the circadian rhythm in melatonin release from the pineal organ of a teleost, ayu (*Plecoglossus altivelis*) in flow-through culture. *Brain Res.* **982**:131-135.
- IGO, M., FUJIMOTO, Y., GUNJI-SUZUKI, M., YOKOSUKA, M., HARA, M., OHTANI-KANEKO, R., TABATA, M., AIDA, K. e HIRATA, K. (2004). Circadian rhythm of melatonin release from the photoreceptive pineal organ of a teleost, ayu (*Plecoglossus altivelis*) in flow-through culture. *J.Neuroendocrinol.* **16**:45-51.
- INUI, A. (1999). Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved? *TiPS* **20**:43-46.
- ISORNA, E. (1999). Liberación rítmica de melatonina en copas ópticas de *Rana perezi* cultivadas en superfusión: regulación por el fotoperiodo y la temperatura. Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.
- ISORNA, E., GUIJARRO, A.I., DELGADO, M.J., ALONSO-BEDATE, M. y ALONSO-GÓMEZ, A.L. (2004). Characterization of melatonin binding sites in the brain and retina of the frog *Rana perezi*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **135**:259-267.

- IVANOVA, T.N. e IUVONE, P.M. (2003). Melatonin synthesis in retina: circadian regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase activity in cultured photoreceptor cells of embryonic chicken retina. *Brain Res.* **973**:56-63.
- IUVONE, P.M. y ALONSO-GÓMEZ, A.L (1998). Melatonin in the vertebrate retina. En: *Retine, luminiere, et radiations*. (Eds.: Christen, Y., Doly, M. y Dory-Lefaix, M.T.). Irvin, Paris. pp. 49-62.
- IUVONE, P.M. y BESHARSE, J.C. (1983). Regulation of indoleamine N-acetyltransferase activity in the retina: effects of light and dark, protein synthesis inhibitors and cyclic nucleotide analogs. *Brain Res.* **273**:111-119.
- JACOB, N., VUILLEZ, P., MØLLER, M. y PÉVET, P. (1998). Photoperiodic dependent changes in the number of neurons containing mRNA encoding neuropeptide Y in the intergeniculate leaflet of Syrian hamster. *Brain Res.* **813**:160-166.
- JENSEN, J. (2001). Regulatory peptides and control of food intake in non-mammalian vertebrates. *Comp.Biochem.Physiol.* **128A**:471-479.
- JHANWAR-UNIYAL, M., BECK, B., BURLET, C. y LEIBOWITZ, S.F. (1990). Diurnal rhythm of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the suprachiasmatic, arcuate and paraventricular nuclei and other hypothalamic sites. *Brain Res.* **536**:331-334.
- JIN, X., SHEARMAN, L.P., WEAVER, D.R., ZYLKA, M.J., DE VRIES, G.J. y REPPERT, S.M. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* **96**:57-68.
- JOBLING, M., JOHANSEN, S.J.S., FOSHAUNG, H., BURKOW, I.C. y JOEGENSEN, E.H. (1998). Lipid dynamics in anadromus Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): seasonal variations in lipid storage depots and lipid class composition. *Fish Physiol.Biochem.* **18**:225-240.
- JOBLING, M., KOSKELA, J. y WINBERG, S. (1999). Feeding and growth of whitefish fed restricted and abundant rations: influences on growth heterogeneity and brain serotonergic activity. *J.Fish Biol.* **54**:437-449.
- JOHNSON, R.M., JOHNSON, T.M. y LONDRVILLE, R.L. (2000). Evidence for leptin expression in fishes. *J.Exp.Zool.* **286**:718-724.
- JOHNSTON, W.L., ATKINSON, J.L. y GLANDVILLE, T. (1992). Effect of PCPA or tryptophan on brain serotonin and on consumption of a high protein or high carbohydrate diet by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J.Nutr.Biochem.* **3**:421-428.
- JONES, J.E., PICK, R.R., DETTLOFF, S.L. y WADE, G.N. (2004). Metabolic fuels, neuropeptide Y, and estrous behavior in Syrian hamsters. *Brain Res.* **1007**:78-85.
- JOPE, T., LAMMERT, A., KRATZSCH, J., PAASCH, U. y GLANDER, H.J. (2003). Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *Int.J.Androl.* **26**:335-341.
- JORGENSEN, E.H., JOHANSEN, S.J.S. y JOBLING, M. (1997). Seasonal patterns of growth, lipid deposition and lipid depletion in anadromus Arctic charr. *J.Fish Biol.* **51**:312-326.
- JOVER, M., PÉREZ, L. y RUANO, R. (1997). Growth of tench maintained on extruded feed of different protein and carbohydrate content: preliminary results. 2<sup>nd</sup> International Workshop on Biology and Culture of the tench (*Tinca tinca*), Badajoz, Spain. Abstracts, 3.P.3.

- JOY, K.P., SENTHILKUMARAN, B. y SUDHAKUMARI, C.C. (1998). Periovulatory changes in hypothalamic and pituitary monoamines following GnRH analogue treatment in the catfish *Heteropneustes fossilis*: a study correlating changes in plasma hormone profiles. *J.Endocrinol.* **156**:365-372.
- KADRI, S., METCALFE, N.B., HUNTINGFORD, F.A. y THORPE, J.E. (1997). Daily feeding rhythms in Atlantic salmon II: size-related variation in feeding patterns of post-smolts under constant environmental conditions. *J.Fish Biol.* **50**:273-279.
- KAIYA, H., KOJIMA, M., HOSODA, H., KODA, A., YAMAMOTO, K., KITAJIMA, Y., MATSUMOTO, M., MINAMITAKE, Y., KIKUYAMA, S. y KANGAWA, K. (2001). Bullfrog ghrelin is modified by *n*-octanoic acid at its third threonine residue. *J.Biol.Chem.* **276**:40441-40448.
- KAIYA, H., VAN DER GEYTEN, S., KOJIMA, M., HOSODA, H., KITAJIMA, Y., MATSUMOTO, M., GEELISSEN, S., DARRAS, V.M. y KANGAWA, K. (2002). Chicken ghrelin, purification, cDNA cloning, and biological activity. *Endocrinology* **143**:3454-3463.
- KAIYA, H., KOJIMA, M., HOSODA, H., RILEY, L.G., HIRANO, T., GRAU, E.G. y KANGAWA, K. (2003a). Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J.Endocrinol.* **176**:415-423.
- KAIYA, H., KOJIMA, M., HOSODA, H., RILEY, L.G., HIRANO, T., GRAU, E.G. y KANGAWA, K. (2003b). Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp.Biochem.Physiol.* **135B**:421-429.
- KALRA, S.P., BAGNASCO, M., OTUKONYONG, E.E., DUBE, M.G. y KALRA, P.S. (2003). Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity. *Regul.Peptides* **111**:1-11.
- KAMEGAI, J., TAMURA, H., SHIMIZU, T., ISHII, S., SUGIHARA, H. y WAKABAYASHI, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* **50**:2438-2443.
- KANABROCKI, E.L., HERMIDA, R.C., WRIGHT, M., YOUNG, R.M., BREMNER, F.W., THIRD, J.L., RYAN, M.D., AYALA, D.E., JOHNSON, M., NEMCHAUSSKY, B.A., SHIRAZI, P., SCHEVING, L.E. y OLWING, J.H. (2001). Circadian variation of serum leptin in healthy and diabetic men. *Chronobiol.Int.* **18**:273-283.
- KARILA, P., MESSENGER, J. y HOLMGREN, S. (1997). Nitric oxide synthase- and NPY-containing subpopulations of sympathetic neurons in the coeliac ganglion of the Atlantic cod, *Gadus morhua*, revealed by immunohistochemistry and retrograde tracing from the stomach. *J.Auton.Nerv.Syst.* **66**:35-45.
- KAVADIAS, S., CASTRITSI-CATHARIOS, J., DESSYPRIS, A. y MILIOU, H. (2004). Seasonal variation in steroid hormones and blood parameters in cage-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J.Appl.Ichtiol.* **20**:58-63.
- KAVALIERS, M. (1979). Pineal involvement in the control of circadian rhythmicity in the lake chub, *Couesius plumbeus*. *J.Exp.Zool.* **209**:33-40.
- KAVALIERS, M. (1981). Circadian organization in the white suckers *Catostomus commersoni*: The role of the pineal organ. *Comp.Biochem.Physiol.* **68A**:127-129.

- KEISLER, D.H., DANIEL, J.A. y MORRISON, C.D. (1999). The role of leptin in nutritional status and reproductive function. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* **54**:425-435.
- KEZUKA, H., FURUKAWA, K., AIDA, K. y HANYU, I. (1988). Daily cycles in plasma melatonin levels under long or short photoperiods in common carp, *Cyprinus carpio*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **72**:296-302.
- KEZUKA, H., AIDA, K. y HANYU, I. (1989). Melatonin secretion from goldfish pineal gland in organ culture. *Gen.Comp.Endocrinol.* **75**:217-221.
- KEZUKA, H., IIGO, M., FURUKAWA, K., AIDA, K. y HANYU, I. (1992). Effects of the photoperiod, pinealectomy and ophthalmectomy on circulating melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*. *Zool.Sci.* **9**:1047-1053.
- KHAN, I.A. y JOY, K.P. (1987). Diurnal variation in, and effects of long photoperiod-raised temperature and melatonin on hypothalamic oxidase activity in the teleost *Channa punctatus*. *J.Interdiscipl.Cycle Res.* **18**:287-292.
- KHAN, I.A. y JOY, K.P. (1988a). Seasonal and daily variations in hypothalamic monoamine levels and monoamine oxidase activity in the teleost *Channa punctatus* (Bloch). *Chronobiol.Int.* **5**:311-316.
- KHAN, I.A. y JOY, K.P. (1988b). Diurnal variation in hypothalamic monoamine levels in the teleost *Channa punctatus* (Bloch) in response to melatonin under two photothermal conditions. *Fish Physiol.Biochem.* **5**:187-190.
- KHAN, I.A. y THOMAS, P. (1993). Immunocytochemical localization of serotonin and gonadotropin-releasing hormone in the brain and pituitary gland of the Atlantic croaker *Micropogonias undulatus*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **91**:167-180.
- KLINGENSPOR, M., DICKOPP, A., HELDMAIER, G. y KLAUS, S. (1996). Short photoperiod reduces leptin gene expression in white and brown adipose tissue of Djungarian hamsters. *FEBS Lett.* **399**:290-294.
- KLINGENSPOR, M., NIGGEMANN, H. y HELDMAIER, G. (2000). Modulation of leptin sensitivity by short photoperiod acclimation in Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *J.Comp.Physiol.* **170**:37-43.
- KOJIMA, M., HOSODA, H., DATE, Y., NAKAZATO, M., MATSUO, H. y KANGAWA, K. (1999). Ghrelin is a novel growth hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**:656-660.
- KOLACZYNSKI, J.W., CONSIDINE, R.V., OHANNESIAN, J., MARCO, C., OPENTANOVA, I., NYCE, M.R., MYINT, M. y CARO, J.F. (1996). Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans, a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* **45**:1511-1515.
- KONTUREK, S.J., KONTUREK, J.W., PAWLIK, T. y BRZOWSKI, T. (2004). Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J.Physiol.Pharmacol.* **55**:137-154.
- KORF, H.W., SCHOMERUS, C. y STEHLE, J.H. (1998). The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv.Anat.Embriol.Cell Biol.* **146**:1-100.
- KOSKELA, J., PIRHONEN, J. y JOBLING, M. (1997). Variations in feed intake and growth of Baltic salmon and brown trout exposed to continuous light at constant low temperature. *J.Fish Biol.* **50**:837-845.

- KOWALSKI, T.J., STER, A.M. y SMITH, G.P. (2002). Increased hypothalamic neuropeptide Y expression in deprived preweanling rats is reversed by intragastric infusion of milk. *Physiol.Behav.* **75**:425-432.
- KRARUP, T., DALL, R., HOSODA, H., KOJIMA, M., KANGAWA, K., CHRISTIANSEN, J.S. y JØRGENSEN, J.O.L. (2002). Weight loss increases circulating levels of ghrelin. *Clin.Endocrinol.* **56**:203-206.
- KRAUSE, D.N. y DUBOCOVICH, M.L. (1990). Regulatory sites in the melatonin system of mammals. *Trends Neurosci.* **13**:464-470.
- KRONFELD-SCHOR, N., RICHARDSON, C., SILVA, B.A., KUNZ, T.H. y WIDMAIER, E.P. (2000). Dissociation of leptin secretion and adiposity during prehibernatory fattening in the little brown bats. *Am.J.Physiol.* **279**:R1277-R1281.
- KRÜGEL, U., SCHAFT, T., KITTNER, H., KIESS, W. e ILLES, P. (2003). Basal and feeding-evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens is depressed by leptin. *Eur.J.Pharmacol.* **482**:185-187.
- KUBŮ, F. y KOUŘIL, J. (1985). The tench. *Vodňany.Česk.Ryb.Svaz.* pp. 97.
- KULCZYKOWSKA, E., WARNE, J.M. y BALMENT, R.J. (2001). Day-night variations in plasma melatonin and arginine vasotocin concentrations in chronically cannulated flounder (*Platichthys flesus*). *Comp.Biochem.Physiol.* **130A**:827-834.
- KUME, K., ZYLKA, M.J., SIRIAM, S., SCHARMAN, L.P., WEAVER, D.R., JIN, X., MAYWOOD, E.S., HASTINGS, M.H. y REPERT, S.M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**:193-205.
- KYRKOULI, S.E., STANLEY, B.G., HUTCHINSON, R., SEIRAFI, R.D. y LEIBOWITZ, S.F. (1990). Peptide-amine interactions in the hypothalamic paraventricular nucleus: analysis of galanin and neuropeptide Y in relation to feeding. *Brain Res.* **521**:185-191.
- LAIDLEY, C.W. y LEATHERLAND, J.F. (1988). Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormones, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Comp.Biochem.Physiol.* **89A**:495-503.
- LAKHDAR-GHAZAL, N., OUKOUCHOU, R. y PÉVET, P. (1995). Seasonal variation in NPY immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert hibernator. *Neurosci.Lett.* **193**:49-52.
- LAMAS, J., SANTOS, Y., BRUNO, D.W., TORANZO, A.E. y Anadón, R. (1994). Non-specific cellular responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *J.Fish Biol.* **45**:839-854.
- LANGENDONK, J.G., PIJL, H., TOORNVLIET, A.C., BURGGRAAF, J., FROLICH, M., SCHOEMAKER, R.C. DOORNBOS, J., COHEN, A.F. y MEINDERS, A.E. (1998). Circadian rhythm of plasma leptin levels in upper and lower body obese women: influence of body fat distribution and weight loss. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **83**:1706-1712.
- LANGSTON, A.L., HOARE, R., STEFANSSON, M., FITZGERALD, R., WERGELAND, H. y MULCAHY, M. (2002). The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **12**:61-76.

- LARHAMMAR, D. (1997). Extraordinary structural diversity of NPY-family receptors. En: *Neuropeptide Y and drug development*. (Eds.: Grundemar, L. y Bloom, S.R.). Academic Press, San Diego. pp. 87-103.
- LARHAMMAR, D., ARVIDSSON, A.-K., BERGLUND, M.M., LUNDELL, Y., SALANECK, E., SÖDERBERG, C., STARBÄCK, P., WRAITH, A. y GEHLERT, D.R. (1997). Evolution of neuropeptide Y and its receptors. En: *Advances in comparative endocrinology*. (Eds.: Kawashima, S. y Kikuyama, S.). Proceedings of the XIII<sup>th</sup> International Congress of Comparative Endocrinology. 17-21 November. Yokohama, Japan. pp. 551-557.
- LARHAMMAR, D., WRAITH, A., BERGLUND, M.M., HOLMBERG, S.K.S. y LUNDELL, Y. (2001). Origins of the many NPY-family receptors in mammals. *Peptides* **22**:295-307.
- LARSON, E.T., FREDRIKSSON, R., JOHANSSON, S.R.T. y LARHAMMAR, D. (2003). Cloning, pharmacology, and distribution of the neuropeptide Y-receptor Yb in rainbow trout. *Peptides* **24**:385-395.
- LAUGHLIN, G.A. y YEN, S.S.C. (1997). Hypoleptinemia in women athletes: absence of diurnal rhythm with amenorrhea. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **82**:318-321.
- LEATHERLAND, J.F., FABRIDGE, K.J. y BOUJARD, T. (1992). Lunar and semi-lunar rhythms in fishes. En: *Rhythms in fishes*. (Ed.: Ali, M.A.). Plenum Press, New York. pp. 83-107.
- LECKLIN, A., LUNDELL, I., PAANANEN, L., WIKBERG, J.E., MANNISTO, P.T. y LARHAMMAR, D. (2002). Receptor subtypes Y1 and Y5 mediate neuropeptide Y induced feeding in the guinea-pig. *Br.J.Pharmacol.* **135**:2029-2037.
- LEE, H.M., WANG, G., ENGLANDER, E.W., KOJIMA, M. y GREELEY, G.H.JR. (2002). Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine and dietary manipulation. *Endocrinology* **143**:185-190.
- LEIBOWITZ, S.F. (1995). Brain peptides and obesity: pharmacologic treatment. *Obesity Res.* **3**:S573-S589.
- LEIBOWITZ, S.F. y ALEXANDER, J.T. (1998). Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol.Psychiatry* **44**:851-864.
- LEONARD, J.B.K. y MCCORMICK, S.D. (1999). Changes in haematology during upstream migration in American shad. *J.Fish Biol.* **54**:1218-1230.
- LEONARD, J.B.K., WALBIESER, G.C. y SILVERSTEIN, J.T. (2001). Neuropeptide Y sequence and messenger RNA distribution in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Mar.Biotechnol.* **3**:111-118.
- LEONARDI, M.O. y KLEMPAU, A.E. (2003). Artificial photoperiod influence on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the southern Hemisphere. *Aquaculture* **221**:581-591.
- LERNER, A.B., CASE, J.D., TAKAHASI, Y., LEE, T.H. y MORI, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J.Am.Chem.Soc.* **80**:2857-2858.
- LEVINE, A.S. y BILLINGTON, C.J. (1997). Why do we eat? A neural system approach. *Ann.Rev.Nutr.* **17**:597-619.

- LI, C., IOFFE, E., FIDAHUSEIN, N., CONNOLLY, E. y FRIEDMAN, J.M. (1998). Absence of soluble leptin receptor in plasma from dbpas/dbpas and other db/db mice. *J.Biol.Chem.* **273**:10078-10082.
- LICINIO, J., NEGRÃO, A.B., MANTZOROS, C., KAKLAMANI, V., WONG, M.L., BONGIORNO, P.B., NEGRO, P.P., MULLA, A., VELDHUIS, J.D., CEARNAL, L., FLIER, J.S. y GOLD, P.W. (1998). Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **83**:4140-4147.
- LIM, C. y KLESIOUS, P.K. (2003). Influence of feed deprivation on hematology, macrophage chemotaxis, and resistance to *Edwardsiella ictaluri* challenge of channel catfish. *J.Aquat.Anim.Health* **15**:13-20.
- LINCOLN, G.A. y RICHARDSON, M. (1998). Photo-neuroendocrine control of seasonal cycles in body weight, pelage growth and reproduction: lessons from the HPD sheep model. *Comp.Biochem.Physiol.* **119C**: 283-294.
- LOCHMILLER, R.L., WEICHMAN, J.D. y ZALE, A.V. (1989). Hematological assesment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of stripped bass (*Morone saxatilis*). *Comp.Biochem.Physiol.* **93**:535-541.
- LOIR, M. (1990). Trout steroidogenic cells in primary culture. I. Changes in free and conjugated androgen and progestagen secretion: effects of gonadotropin, serum, and lipoproteins. *Gen.Comp.Endocrinol.* **78**:374-387.
- LONDRVILLE, R.L. y DUVAL, C.S. (2002). Murine leptin injections increase intracellular fatty acid-binding protein in green sunfish (*Lepomis cyanellus*). *Gen.Comp.Endocrinol.* **129**:56-62.
- LÓPEZ-PATIÑO, M.A. (2004). Receptores centrales y periféricos de melatonina en el teleosteo *Tinca tinca*. Caracterización, farmacología y ritmicidad diaria y estacional. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- LÓPEZ-PATIÑO, M.A., GUIJARRO, A.I., DELGADO, M.J., ALONSO-BEDATE, M. y DE PEDRO, N. (1999). Neuropeptide Y has a stimulatory action on feeding behaviour in goldfish (*Carassius auratus*). *Eur.J.Pharmacol.* **377**:147-153.
- LOVE, R.M. (Ed.). (1970). The chemical biology of fishes. Academic Press, New York. pp. 547.
- LOWE, T.E. y WELLS, R.M.G. (1997). Exercise challenge in Antarctic fishes: do haematology and muscle metabolite levels limit swimming performance? *Polar Biol.* **17**:211-218.
- LOWE-JINDE, L. y NIIMI, A.J. (1983). Influence of sampling on the interpretation of haematological measurements of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can.J.Zool.* **61**:396-402.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.R. y RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**:265-275.
- LUKOVICZ, M. y PROSKE, C. (1979). Production and reproduction of tench. *Riv.Ital.Piscic.Ittiopat.* **14**:109-112.
- LUNDELL, Y., BERGLUND, M.M., STARBÄCK, P., SALENECK, E., GHLERT, D.R. y LARHAMMAR, D. (1997). Cloning and characterization of a novel neuropeptide Y receptor subtype in the zebrafish. *DNA Cell Biol.* **16**:1357-1363.
- LUSKOVA, V. (1997). Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes. *Acta Sc.Nat.Brno* **31**:70.

- LUSKOVA, V. (1998). Factors affecting haematological indices in free-living fish populations. *Acta Vet.Brno* **67**:249-255.
- MA, Z., GINGERICH, R.L., SANTIAGO, J.V., KLEIN, S., SMITH, C.H. y LANDT, M. (1996). Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clin.Chem.* **42**:942-946.
- MACFARLANE, R.B., NORTON, E.C. y BOWERS, M.J. (1993). Lipids dynamics in relation to the annual reproductive cycle in yellowtail rock-fish (*Sebastes flavidus*). *Can.J.Aquat.Sci.* **50**:391-401.
- MACHADO, C.R., GAROFALO, M.A.R., ROSELINO, J.E.S., KETTELHUT, I.C. y MIGLIORINI, R.H. (1988). Effects of starvation, refeeding and insulin on energy-linked metabolic process in catfish (*Rhamdia hilarii*) adapted to carbohydrate-rich diet. *Gen.Comp.Endocrinol.* **71**:429-437.
- MADRID, J.A., BOUJARD, T. y SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2001). Feeding rhythms. En: *Food intake in fish*. (Eds.: Houlihan, D., Boujard, T. y Jobling, M.). Blackwell Science Ltd., Oxford. pp. 189-215.
- MAFFEI, M., HALAAS, J., RAVUSSIN, E., PRATLEY, R.E., LEE, G.H., ZHANG, Y., FEI, H., KIM, S., LALLONE, R., RANGANATHAN, S., KERN, P.A. y FRIEDMAN, J.M. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med.* **1**:1155-1161.
- MAGILL, S.H. y SAYER, D.J. (2004). The effect of reduced temperature and salinity on the blood physiology of juvenile Atlantic cod. *J.Fish.Biol.* **64**:1193-1205.
- MAHAJAN, C.L. y DHEER, T.R. (1983). Haematological and haematopoietic responses to starvation in an airbreathing fish *Channa punctatus* Bloch. *J.Fish Biol.* **22**:111-123.
- MALPAUX, B., DAVEAU, A., MAURICE-MANDON, F., DUARTE, G. y CHEMINEAU, P. (1998). Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* **139**:1508-1516.
- MANICKAM, P. y JOY, K.P. (1990). Changes in hypothalamic catecholamine levels in relation to season, ovariectomy, and 17-beta-estradiol replacement in the catfish, *Clarias batrachus* (L.). *Gen.Comp.Endocrinol.* **80**:167-174.
- MARKIEWICZ, W., JAROSZEWSKI, J.J., BOSSOWSKA, A. y MAJEWSKI, M. (2003). NPY: its occurrence and relevance in the female reproduction system. *Folia Histochem.Cytobiol.* **41**:183-192.
- MARQUES TELLES, M., BARROS GUIMARÃES, R. y BERALDI RIBEIRO, E. (2003). Effect of leptin on the acute feeding-induced hypothalamic serotonergic stimulation in normal rats. *Regul.Pept.* **115**:11-18.
- MARTÍNEZ, F.J., GARCÍA-RIERA, M.P., CANTERAS, M., DE COSTA, J. y ZAMORA, S. (1992). Simultaneous effect of initial weight, initial crowding, temperature and O<sub>2</sub> concentration on the nutritional use of food by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch.Int.Physiol.Biochem.Biophys.* **100**:247-250.
- MARTÍNEZ, F.J., GARCÍA-RIERA, M.P., CANTERAS, M., DE COSTA, J. y ZAMORA, S. (1994). Blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): simultaneous influence of various factors. *Com.Biochem.Physiol.* **107A**:95-100.



- MARTÍNEZ, M., COUTURE, P. y GUDERLEY, H. (1999). Temporal changes in tissue metabolic capacities of wild Atlantic cod *Gadus morhua* (L.), from Newfoundland. *Fish Physiol.Biochem.* **20**:181-191.
- MARTÍNEZ-MERLOS, M.T., ÁNGELES-CASTELLANOS, M., DÍAZ-MUÑOZ, M., AGUILAR-ROBLERO, R., MENDOZA, J. y ESCOBAR, C. (2004). Disociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J.Endocrinol.* **181**:53-63.
- MARX, J. (2003). Cellular warriors at the battle of the bulge. *Science* **299**:846-849.
- MASSON-PÉVET, M., GAUER, F. y PÉVET, P. (1993). Melatonin regulation of melatonin receptor density in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei. En: *Melatonin and the pineal gland, from basic science to clinical application*. (Eds.: Touitou, Y., Arendt, J. y Pévet, P.). Excerpta medica, Amsterdam. pp. 99-104.
- MASSON-PÉVET, M., BIANCHI, M. y PÉVET, P. (1996a). Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: comparison with light induction of fos-related protein. *J.Neurosci.Res.* **43**:632-637.
- MASSON-PÉVET, M., GAUER, F. y RECIO, J. (1996b). Melatonin receptors, pars tuberalis and photoperiodic response. *Front.Horm.Res.* **21**:84-89.
- MASUDA, T., IIGO, M., MIZUSAWA, K., NARUSE, M., OISHI, T., AIDA, K. y TABATA, M. (2003). Variations in plasma melatonin levels of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under various light and temperature conditions. *Zool.Sci.* **20**:1011-1016.
- MATOS, F.F., GUSS, V. y KORPINEN, C. (1996). Effects of neuropeptide Y (NPY) and [D-TRP<sup>32</sup>]NPY on monoamine and metabolite levels in dialysates from rat hypothalamus during feeding behavior. *Neuropeptides* **30**:391-398.
- MATSUMOTO, M., HOSODA, H., KITAJIMA, Y., MOROZUMI, N., MINAMITAKE, Y., TANAKA, S., MATSUO, H., KOJIMA, M., HAYASHI, Y. y KANGAWA, K. (2001). Structure-activity relationship of ghrelin: Pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **287**:142-146.
- MAX, M. y MENAKER, M. (1992). Regulation of melatonin production by light, darkness, and temperature in the trout pineal. *J.Comp.Physiol.* **170A**:479-489.
- MAZURAS, D., BRIERLEY, I., ANGLADE, I., DREW, J., RANDALL, C., BROMAGE, N., MICHEL, D., KAH, O. y WILLIAMS, L.M. (1999). Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J.Comp.Neurol.* **409**:313-324.
- MAZURAS, D., LE DRÉAN, G., BRIERLEY, I., ANGLADE, I., BROMAGE, N., WILLIAMS, L.M. y KAH, O. (2000). Expression of clock gene in the brain of rainbow trout: comparison with the distribution of melatonin receptors. *J.Comp.Neurol.* **422**:612-620.
- MCCORD, C.P. y ALLEN, P.F. (1917). Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J.Exp.Zool.* **23**:207-224.
- MCCORMICK, S.D. y NAIMAN, R.J. (1985). Hypoosmoregulation in an anadromous teleost: influence of sex and maturation. *J.Exp.Zool.* **234**:193-198.
- MCVEY, D.C., RITTSCHOF, D., MANNON, P.J. y VIGNA, S.R. (1996). Localization/characterization of neuropeptide Y/peptide YY receptors in the brain of the smooth dogfish (*Mustelis canis*). *Regul.Peptides* **61**:167-173.

- MEGUID, M.M., FETISSOV, S.O., VARMA, M., SATO, T., ZHANG, L.H., LAVIANO, A. y ROSSIFANELLI, F. (2000). Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* **16**:843-857.
- MEIER, A.H. (1992). Circadian basis for neuroendocrine regulation. En: *Rhythms in fishes*. (Ed.: Ali, M.A.). Plenum Press, New York. pp. 109-126.
- MEISTER, B. (2000). Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam.Horm.* **59**:265-304.
- MELINGEN, G.O., PETTERSEN, E.F. y WERGELAND, H.I. (2002). Leucocyte populations and responses to immunization and photoperiod manipulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 0 + smolt. *Aquaculture* **214**:381-396.
- MERCALDO-ALLEN, R., DAWSON, M.A., KUROPAT, C.A. y KAPAREIKO, D. (2003). Variability in blood chemistry of yellowtail flounder, *Limanda ferruginea*, with regard to sex, season, and geographic location. *NOAA-TM-NMFS-NE-180*.
- MERCER, J.G., LAWRENCE, C.B., BECK, B., BURLET, A., ATKINSON, T. y BARRET, P. (1995). Hypothalamic NPY and preproNPY mRNA in Djungarian hamsters: effect of food deprivation and photoperiod. *Am.J.Physiol.* **269**:R1099-R1106.
- MERCER, J.G., HOGGARD, N., WILLIAMS, L.M., LAWRENCE, C.B., HANNAH, L.T. y TRAYHURN, P. (1996). Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by *in situ* hybridization. *FEBS Lett.* **387**:113-116.
- MERCER, J.G., MOAR, K.M., ROSS, A.W. y MORGAN, P.J. (2000). Regulation of leptin receptor, POMC and AGRP gene expression by photoperiod and food deprivation in the hypothalamic arcuate nucleus of male Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Appetite* **34**:109-111.
- MESSAGER, S., ROSS, A., BARRET, P. y MORGAN, P.J. (1999). Decoding photoperiodic timing through Per1 and ICER gene amplitude. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **96**:9938-9943.
- MIDGLEY, A.R.JR., NISWENDER, G.D. y REBAR, R.W. (1969). Principles for the assesment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity). *Acta Endocrinol.Suppl.* **142**:163-180.
- MÍGUEZ, R.M., RECIO, J., VIVIEN-ROELS, B. y PÉVET, P. (1996). Diurnal changes in the content of indoleamines, catecholamines and methoxyindoles in the pineal gland of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*): effect of photoperiod. *J.Pineal Res.* **21**:7-14.
- MISTLBERGER, R.E. (1994). Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci.Behav.Rev.* **18**:171-195.
- MISTLBERGER, R.E., MARCHANT, E.G. y KIPPIN, T.E. (2001). Food-entrained circadian rhythms in rats are insensitive to deuterium oxide. *Brain Res.* **919**:283-291.
- MIZUSAWA, K., IIGO, M., MASUDA, T. y AIDA, K. (2000). Photic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase 1 mRNA in trout retina. *Neuroreport* **11**:3473-3477.
- MOMMSEN, T.P. (1998). Growth and metabolism. En : *The physiology of fishes*. (Ed.: Evans, D.H.). CRC Press, New York. pp. 65-97.
- MONTGOMERY, R. (1957). Determination of glycogen. *Arch.Biochem.Biophys.* **67**:378-386.

- MOON, T.W. y FOSTER, G.D. (1995). Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. En: *Biochemistry and molecular biology of fishes*. (Eds.: Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P.). Elsevier Science B.V. pp. 393-434.
- MOORE, R.Y. y CARD, J.P. (1989). Neuropeptide Y and the circadian system. En: *Nobel Symposium XIV: Neuropeptide Y*. (Eds.: Mutt, V., Hökfelt, T. y Fuxe, K.). Raven Press, New York. pp. 293-301.
- MOORE, R.Y. y SILVER, R. (1998). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cronobiol.Int.* **15**:475-487.
- MOORE-EDE, M.C., SULZMAN, F.M. y FULLER, C.A. (1982). *The clocks that time us*. Harvard University Press, Cambridge.
- MORAES, G., AVILEZ, I.M., ALTRAN, A.E. y BARBOSA, C.C. (2002). Biochemical and hematological responses of the banded knife fish *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) exposed to environmental hypoxia. *Braz.J.Biol.* **62**:633-640.
- MORAN, O. y PHILLIP, M. (2003). Leptin: obesity, diabetes and other peripheral effects – a review. *Pediatric Diabetes* **4**:101-109.
- MORAWSKA, N. (1981). Effect of different thermal regimes on reproductive cycles of tench *Tinca tinca* (L.). Part V. Method of fecundity stimulation. *Pol.Arch.Hydrobiol.* **28**:217-227.
- MORGAN, P.J. (2000). The pars tuberalis: The missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion? *J.Neuroendocrinol.* **12**:287-295.
- MORIEN, A., WELLMAN, P.J. y FOJT, J. (1995). Diurnal rhythms of paraventricular hypothalamic norepinephrine and food intake in rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **52**:169-174.
- MORIEN, A., WELLMAN, P.J. y CASSONE, V.M. (1999). Diurnal changes in paraventricular hypothalamic  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -adrenoreceptors and food intake in rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **63**:33-38.
- MØRKØRE, T. y RØRVIK, K.A. (2001). Seasonal variations in growth, feed utilization and product quality of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) transferred to seawater as 0+ smolts or 1+ smolts. *Aquaculture* **199**:145-158.
- MORRIS, Y.A. y CREWS, D. (1990). The effects of exogenous neuropeptide Y on feeding and sexual behavior in the red-sided garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*). *Brain Res.* **530**:339-341.
- MORTON, M.L. (1994). Hematocrits in montanesparrows in relation to reproductive schedule. *Condor* **96**:119-126.
- MORTON, D.J. y FORBES, H.J. (1988). Pineal gland N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): seasonal variation linked to photoperiod. *Neurosci.Lett.* **94**:333-337.
- MUCCIOLI, G., PAPPOTI, M., LOCATELLI, V., GHIGO, E. y DEGHENGI, R. (2001). Binding of  $^{125}$ I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *J.Endocrinol.Invest.* **24**:RC7-RC9.

- MUCCIOLI, G., TSCHÖP, M., PAPPOTI, M., DEGHENGI, R., HEIMAN, M. y GHIGO, E. (2002). Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur.J.Pharmacol.* **440**:235-254.
- MULCAHY, M.F. (1970). Blood values in the pike *Exos lucius* L. *J.Fish Biol.* **2**:203-209.
- MULET, T., PICÓ, C., OLIVER, P. y PALOU, A. (2003). Blood leptin homeostasis: sex-associated differences in circulating leptin levels in rats are independent of tissue leptin expression. *Int.J.Biochem.Biol.* **35**:104-110.
- MULLER, A.F., LAMBERTS, S.W., JANSSEN, J.A., HOFLAND, L.J., KOETSVELD, P.V., BIDLINGMAIER, M., STRASBURGER, C.J., GHIGO, E. y VAN DER LELY, A.J. (2002). Ghrelin drives GH secretion during fasting in man. *Eur.J.Endocrinol.* **146**:203-207.
- MURAKAMI, N., NAKAMURA, H., NISHI, R., MARUMOTO, N. y NASU, T. (1994). Comparison of circadian oscillation of melatonin release in pineal cells of house sparrow, pigeon and Japanese quail, using cell perfusion systems. *Brain Res.* **651**:209-14
- MURAYAMA, T., KAWASHIMA, M., TAKAHASHI, T., YASUOKA, T., KUWAYAMA, T. y TANAKA, K. (1997). Direct action of melatonin on hen ovarian granulosa cells to lower responsiveness to luteinizing hormone. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **215**:386-392.
- MURUZÁBAL, F.J., FRÜHBECK, G., GÓMEZ-AMBROSI, J., ARCHANCO, M. y BURREL, M.A. (2002). Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. *Gen.Comp.Endocrinol.* **128**:149-152.
- MUSTONEN, A.M., NIEMINEN, P. y HYVÄRINEN, H. (2002a). Leptin, ghrelin, and energy metabolism of the spawning burbot *Lota lota* (L.). *J.Exp.Zool.* **293**:119-126.
- MUSTONEN, A.M., NIEMINEN, P. y HYVÄRINEN, H. (2002b). Liver and plasma lipids of spawning burbot. *J.Fish. Biol.* **61**:1318-1322.
- MYERS, R.D., LANKFORD, M.F. y PAEZ, X. (1992). Norepineprine, dopamine, and 5-HT release from perfusate hypothalamus of the rat during feeding induced by neuropeptide Y. *Neurochem.Res.* **17**:1123-1132.
- NAKAMURA, W., HONMA, S., SHIRAKAWA, T. y HONMA, K. (2001). Regional pacemakers composed of multiple oscillator neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur.J.Neurosci.* **14**:666-674.
- NAKAZATO, M., MURAKAMI, N., DATE, Y., KOJIMA, M., MATSUO, H., KANGAWA, K. y MATSUKURA, S. (2001). A role of ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**:194-198.
- NARNAWARE, Y.K. y PETER, R.E. (2001a). Neuropeptide Y stimulates food consumption through multiple receptors in goldfish. *Physiol.Behav.* **74**:185-190.
- NARNAWARE, Y.K. y PETER, R.E. (2001b). Effects of food deprivation and refeeding on neuropeptide Y (NPY) mRNA levels in goldfish. *Comp.Biochem.Physiol.* **129B**:633-637.
- NARNAWARE, Y.K. y PETER, R.E. (2002). Influence of diet composition on food intake and neuropeptide Y (NPY) gene expression in goldfish brain. *Regul.Peptides* **15**:75-83.
- NARNAWARE, Y.K., PEYON, P.P., LIN, X. y PETER, R.E. (2000). Regulation of food intake by neuropeptide Y in goldfish. *Am.J.Physiol.* **279**:R1025-R1034.
- NASSOUR, I. y LÉGER, C.L. (1989). Deposition and mobilization of body fat during sexual maturation in female trout (*Salmo gairdneri*). *Aquat.Living Resour.* **2**:153-159.

- NAVARRO, I. y GUTIÉRREZ, J. (1995). Fasting and starvation. En: *Biochemistry and molecular biology of fishes*. (Eds.: Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P.). Elsevier Science B.V. pp. 393-434.
- NAVARRO, I., GUTIÉRREZ, J. y PLANAS, J. (1992). Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. *Comp.Biochem.Physiol.* **102A**:401-407.
- NIEMINEN, P. y HYVÄRINEN, H. (2000). Seasonality of leptin levels in the BAT of the common shrew (*Sorex araneus*). *Z.Naturforsch* **55C**:455-460.
- NIEMINEN, P., HYVÄRINEN, H., KÄKELÄ, R. y ASIKAINEN, J. (2000). Plasma leptin and thyroxine of mink (*Mustela vison*) vary with gender, diet and subchronic exposure to PCBs. *Comp.Biochem.Physiol.* **127A**:515-522.
- NIEMINEN, P., ASIKAINEN, J. y HYVÄRINEN, H. (2001). Effects of seasonality and fasting on the plasma leptin and thyroxin levels of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonides*) and the blue fox (*Alopex lagopus*). *J.Exp.Zool.* **289**:109-118.
- NIEMINEN, P., MUSTONEN, A.M., ASIKAINEN, J. y HYVÄRINEN, H. (2002). Seasonal weight regulation of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonides*): interactions between melatonin, leptin, ghrelin and growth hormone. *J.Biol.Rhythms* **17**:155-163.
- NIEMINEN, P., MUSTONEN, A.M. y HYVÄRINEN, H. (2003). Fasting reduces plasma leptin- and ghrelin-immunoreactive peptide concentrations of burbot (*Lota lota*) at 2°C but not at 10°C. *Zool.Sci.* **20**:1109-1115.
- NIEWIAROWKI, P.H., BALK, M.L. y LONDRVILLE, R.L. (2000). Phenotypic effects of leptin in an ectotherm: a new tool to study the evolution of life histories and endothermy? *J.Exp.Biol.* **203**:295-300.
- NILSSON, G.E. (1989). Regional distribution of monoamines and monoamine metabolites in the brain of the crucian carp (*Carassius auratus* L.). *Comp.Biochem.Physiol.* **94C**:223-228.
- NORDGARDEN, U., ØRNSRUD, R., HANSEN, T. y HEMRE, G.I. (2003). Seasonal changes in selected muscle quality parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared under natural and continuous light. *Aquacult.Nutr.* **9**:161-168.
- NORTON, E.C. y MACFARLANE, R.B. (1999). Lipid class composition of the viviparous yellowtail rockfish over a reproductive cycle. *J.Fish Biol.* **54**:1287-1299.
- NOSJEAN, O., FERRO, M., COGÉ, F., BEAUVERGET, P., HENLIN, J-M., LEFOULON, F., FAUCHÈRE, J-L., DELAGRANGE, P., CANET, E. y BOUTIN, J.A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J.Biol.Chem.* **275**:31311-31317.
- NOWAK, J.Z. (1990). Control of melatonin formation in vertebrate retina. *Adv.Pineal Res.* **4**:81-90.
- NOWAK, J.Z. y ZAWILSKA, J.B. (1994). Signal transduction mechanisms related to melatonin biosynthesis and receptors in the vertebrate retina. En: *Advances in pineal research*. (Eds.: Møller, M. y Pévet, P.). John Libbey & Company Ltd. pp. 215-227.
- NUESSLEIN-HILDESHEIM, B., O'BRIEN, J.A., EBLING, F.J.P., MAYWOOD, E.S. y HASTINGS, M.H. (2000). The circadian cycle of mPER clock gene products in the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *Eur.J.Neurosci.* **12**:2856-2864.

- OGAWA, Y., MASUZAKI, H., ISSE, N., OKAZAKI, T., MORI, K., SHIGEMOTO, M., SATOH, N., TAMURA, N., HOSODA, K., YOSHIMASA, Y., JINGAMI, H., KAWADA, T. y NAKAO, K. (1995). Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *Clin. Invest.* **96**:1647-1652.
- OKIMOTO, D.K. y STETSON, M.H. (1999). Properties of melatonin-generating system of the sailfin molly, *Poecilia velifera*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **114**:293-303.
- OKITA, M., INUI, A., HIROSUE, Y., MIURA, M., NAKAJIMA, M. y KASUGA, M. (1991). Brain peptide YY receptors: highly conserved characteristics throughout vertebrate evolution. *Endocrinology* **129**:2512-2520.
- OLABUENAGA, S.E. (2000). Sistema inmune en peces. *Gayana (Concepts)* **64**:205-215.
- ORLANDO, G., BRUNETTI, L., CHIARA, D.N., MICHELOTTO, B., RECINELLA, L., CIABATTONI, G. y VACCA, M. (2001). Effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide, leptin and orexins on hypothalamic serotonin release *Eur. J. Pharmacol.* **430**:269-272.
- OROSCO, M. y NICOLAIDIS, S. (1994). Insulin and glucose-induced changes in feeding and medial hypothalamic monoamines revealed by microdialysis in rats. *Brain Res. Bull.* **33**:289-297.
- ORTIZ, R.M., NOREN, D.P., ORTIZ, C.L. y TALAMANTES, F. (2003). GH and ghrelin increase with fasting in a naturally adapted species, the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *J. Endocrinol.* **178**:533-539.
- OUKOUCHOU, R., VIVIEN-ROELS, B., PÉVET, P. y LAKHDAR-GHAZAL, N. (2003). Testosterone-dependent and independent mechanisms involved in the photoperiodic control of neuropeptide Y levels in the brain of the jerbos (*Jaculus orientalis*). *Brain Res.* **967**:63-72.
- ØVERLI, O., HARRIS, C.A. y WINBERG, S. (1999). Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behav. Evol.* **54**:263-275.
- OZAKI, N., DUNCAN, W.C.JR., JOHNSON, K.A. y WERH, T.A. (1993). Diurnal variations of serotonin and dopamine levels in discrete brain regions of Syrian hamsters and their modification by chronic clorgyline treatment. *Brain Res.* **627**:41-48.
- PAGE, M.E., OROSCO, M., ROUCH, C., YAO, O., JACQUOT, C. y BOHUON, C. (1993). Fasting affects more markedly neuropeptide Y than monoamines in the rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **55**:71-75.
- PALYHA, O.C., FEIGNER, S.D., TAN, C.P., MCKEE, K.K., HRENIUK, D.L., GAO, Y.D., SCHLEIM, K.D., YANG, L., MORRIELLO, G.J., NARGUND, R., PATCHETT, A.A., HOWARD, A.D. y SMITH, R.G. (2000). Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R) conserved from pufferfish to human. *Mol. Endocrinol.* **14**:160-169.
- PANG, S.F. y ALLEN, A.E. (1986). Extrapineal-melatonin in the retina: its regulation and physiological functions. *Pineal Res. Rev.* **4**:55-95.
- PANG, S.F., YU, H.S. y TANG, P.L. (1982). Regulation of the melatonin in the retina of the guinea pigs. Effects of the environmental lighting. *J. Exp. Zool.* **222**:11-16.
- PANG, C.S., ALI, M.A., REDDY, P.K., LEATHERLAND, J.F., BROWN, G.M. y PANG, S.F. (1994a). 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding in the brain of four salmonids. *Biol. Signals* **3**:230-238.

- PANG, C.S., ALI, M.A., REDDY, P.K., LEATHERLAND, J.F., BROWN, G.M. y PANG, S.F. (1994b). A comparative study of picomolar affinity 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the hearts of three salmonid species. *Fish Physiol.Biochem.* **13**:371-378.
- PANG, C.S., TANG, P.L., SONG, Y., BROWN, G.M. y PANG, S.F. (1996). 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the quail heart: characteristics, distribution and modulation by guanine nucleotides and cations. *Life Sci.* **58**:1047-1057.
- PANG, C.S., XI, S.C., BROWN, G.M., PANG, S.F. y SHIU, S.Y.W. (2002). 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding and interaction with  $\beta$ -adrenergic signaling in chick heart/coronary artery physiology. *J.Pineal.Res.* **32**:243-252.
- PARENT, A. (1981). Comparative anatomy of the serotonergic systems. *J.Physiol.* **77**:147-156.
- PARENT, A. (1983) The monoamine-containing neuronal systems in the teleostean brain. En: *Fish neurobiology. Higher brain areas and functions.* (Eds.: Davis, R.E. y Northcutt, R.G.). The University of Michigan Press, Michigan. pp. 285-315.
- PARFITT, A., WELLER, J.L. y KLEIN, D.C. (1975). Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin-N-acetyltransferase activity. *Mol.Pharmacol.* **11**:241-255.
- PARHAR, I.S., SATO, H. y SAKUMA, Y. (2003). Ghrelin in cichlid fish is modulated by sex and development. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **305**:169-175.
- PAULOCCHI, M., ROCCO, M. y VARRICCIO, E. (2001). Leptin presence in plasma, liver and fat bodies in the lizard *Podarcis sicula*: fluctuations throughout the reproductive cycle. *Life Sci.* **69**:2399-2408.
- PAVLIDIS, M., BERRY, M., DIVANACH, P. y KENTOURI, M. (1997). Diel pattern of haematocrit, serum metabolites, osmotic pressure, electrolytes and thyroid hormones in sea bass and sea bream. *Aquac.Int.* **5**:237-247.
- PAVLIDIS, M., PASPATIS, M., KOITINEN, M., PAAVOLA, T., DIVANACH, P. y KENTOURI, M. (1999a). Diel rhythms of serum metabolites and thyroid hormones in red porgy held in different photoperiod. *Aquac.Int.* **7**:29-44.
- PAVLIDIS, M., GREENWOOD, L., PAALAVUO, M., MÖLSA, H. y LAITINEN, J.T. (1999b). The effect of photoperiod on diel rhythm in serum melatonin, cortisol, glucose, and electrolytes in the common dentex, *Dentex dentex*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **113**:240-250.
- PEARSON, M.P. y STEVENS, E.D. (1991). Size and haematological impact of the splenic erythrocyte reservoir in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol.Biochem.* **69**:39-50.
- PEARSON, M.P., VAN DER KRAAK, G. y STEVENS, E.D. (1992). In vivo pharmacology of spleen contraction in rainbow trout. *Can.J.Zool.* **70**:625-627.
- PEDRERA, M.I., RODRÍGUEZ, A.B., PARIENTE, J.A., COLLAZOS, M.E. y BARRIGA, C. (1992). Study of the non-specific immunological response of spring tench (*Tinca tinca* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **2**:263-274.
- PEDRERA, M.I., RODRÍGUEZ, A.B., SALIDO, G.M. y BARRIGA, C. (1993). Phagocytic process of head kidney granulocytes of tench (*Tinca tinca* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **3**:411-421.

- PELLEYMUNTER, M.A., CULEN, M.J., BAKER, M.B., HECHT, R., WINTERS, D., BOONE, T. y COLLINS, F. (1995). Effects of the *obese* gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science* **269**:540-543.
- PENG, C., HUANG, Y. y PETER, R.E. (1990). Neuropeptide Y stimulates growth hormone and gonadotropin release from the goldfish pituitary in vitro. *Neuroendocrinology* **52**:28-34.
- PENG, C., HUMPHRIES, S., PETER, R.E., RIVIER, J.E., BLOMQVIST, A.G. y LARHAMMAR, D. (1993). Actions of goldfish neuropeptide Y on the secretion of growth hormone and gonadotropin- $\alpha$  in female goldfish. *Gen.Comp.Endocrinol.* **90**:306-317.
- PENG, C., GALLIN, W., PETER, R.E., BLOMQVIST, A.G. y LARHAMMAR, D. (1994). Neuropeptide Y gene expression in the goldfish brain: distribution and regulation by ovarian steroids. *Endocrinology* **134**:1095-1103.
- PERAGÓN, J., BARROSO, J.B., GARCÍA-SALGUERO, L., DE LA HIGUERA, M. y LUPIÁÑEZ, J.A. (1994). Dietary protein effects on growth and fractional protein synthesis and degradation rates in liver and white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **124**:35-46.
- PÉREZ, E., ZANUY, S. y CARRILLO, M. (1988). Effect of diet and feeding time on variations in plasma insulin, hepatic c-AMP and other metabolites in a teleost fish, *Dicentrarchus labrax* L. *Fish Physiol.Biochem.* **5**:191-197.
- PETER, R.E., TRUDEAU, V.L. y SLOLEY, B.D. (1991). Brain regulation of reproduction in teleost. *Bull.Inst.Zool.Acad.Sinica Monograph* **16**:89-118.
- PÉVET, P., VIVIEN-ROELS, B. y MASSON-PÉVET, M. (1991). Annual changes in the daily pattern of melatonin synthesis and release. En: *Role of melatonin and the pineal peptides in neuroimmunomodulation*. (Eds.: Fraschini, F. y Reiter, R.J.). Plenum, New York. pp. 147-157.
- PEYON, P., SAIED, H., LIN, X. y PETER, R.E. (1999). Postprandial, seasonal and sexual variations in cholecystokinin gene expression in goldfish brain. *Mol.Brain Res.* **74**:190-196.
- PEYON, P., ZANUY, S. y CARRILLO, M. (2001). Action of leptin on in vitro luteinizing hormone release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol.Reprod.* **65**:1573-1578.
- PEYON, P., VEGA-RUBÍN DE CELIS, S., GÓMEZ-REQUENI, P., ZANUY, S., PÉREZ-SÁNCHEZ, J. y CARRILLO, M. (2003). In vitro effect of leptin on somatostatin release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): dependence on the reproductive status and interaction with NPY and GnRH. *Gen.Comp.Endocrinol.* **132**:284-292.
- PEYRETHON, J. y DUSAN-PEYRETHON, D. (1967). Etude polygraphique du cycle veille-sommeil d'un téléostéen (*Tinca tinca*). *C.R.Soc.Biol.* **161**:2533-2537.
- PHLEGER, C.F., LAUB, R.J. y WAMBEKE, S.R. (1995). Selective skeletal fatty acid depletion in spawning Pacific pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*. *Comp.Biochem.Physiol.* **111B**:435-439.
- PICKARD, G.E. y TANG, W. (1994). Pineal photoreceptors rhythmically secrete melatonin. *Neurosci.Lett.* **171**:109-112.
- PICKET, G.D. y PAWSON, M.G. (Eds.) (1994). *Sea bass: Biology, exploitation and conservation*. Chapman y Hall, London.



- PICKERING, A.D. (1986). Changes in blood cell composition of the brown trout, *Salmo trutta* L., during the spawning season. *J.Fish Biol.* **29**:335-347.
- PIERSMA, T., KOOLHAAS, A., DEKINGA, A. y GWINNER, E. (2000). Red blood cell and white blood cell counts in sandpipers (*Philomachus pugnax*, *Calidris canutus*): effects of captivity, season, nutritional status, and frequent bleedings. *Can.J.Zool.* **78**:1349-1355.
- PINILLOS, M.L., DELGADO, M.J. y SCOTT, A.P. (2003). Seasonal changes in plasma gonadal steroid concentrations and gonadal morphology on male and female tench (*Tinca tinca*, L.). *Aquacult.Res.* **34**:1-9.
- PIRONE, A., BETTI, L., MASCIA, G., GIANNACCINI, G., LUCACCHINI, A. y FABIANI, O. (2003). Autoradiographic distribution of neuropeptide Y binding sites in the brain of the carp *Cyprinus carpio* L. (Cyprinidae, Teleostei). *Comp.Biochem.Physiol.* **134A**:757-762.
- PITTS, S., PERONE, E. y SILVER, R. (2003). Food-entrained circadian rhythms are sustained in arrhythmic *Clk/Clk* mutant mice. *Am.J.Physiol.Integr.Comp.Physiol.* **285**:R57-R67.
- PLAUTZ, J.D., KANEKO, M., MAY, J.C. y KAY, S.A. (1997). Independent photoreceptive circadian clocks throughout drosophila. *Science* **278**:1632-1635.
- PONTET, A., DANGER, J.M., DUBOURG, P., PELLETIER, G., VAUDRY, H., CALAS, A. y KAH, O. (1989). Distribution and characterization of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain and pituitary of the goldfish. *Cell. Tissue Res.* **255**:529-538.
- POON, A.M.S., CHOW, P.H., MAK, A.S.Y. y PANG, S.F. (1997). Autoradiographic localization of  $2[^{125}I]$ iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds. *J.Pineal Res.* **23**:5-14.
- POTTI, J., MORENO, J., MERINO, S., FRÍAS, O. y RODRÍGUEZ, R. (1999). Environmental and genetic variation in the haematocrit of fledgling pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Oecologia* **120**:1-8.
- PRAVDA, D., PALÁČKOVÁ, J. y PECHA, O. (1989). Sexual differences in some basic haematological parameters of breeding pikes during the spawning period. Proc. 2<sup>nd</sup> Ichthyematol.Conf., Litomyšl, pp. 7.
- PRESS, C.McL. y EVENSEN, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* **9**:309-318.
- PRIVAT, J., RAVAUULT, J.P., CHESNEAU, D. y FEVRE-MONTAGNE, M. (1999). Day/night variation of tryptophan hydroxylase and serotonin N-acetyltransferase mRNA levels in the ovine pineal gland and retina. *J.Pineal Res.* **26**:193-203.
- PROSSER, R.A. (2000). Serotonergic actions and interactions on the SCN circadian pacemaker: *in vitro* investigations. *Biol.Rhythm Res.* **31**:315-339.
- PU, S., DUBE, M.G., KALRA, P.S., y KALRA, S.P. (2000). Regulation of leptin secretion: effects of aging on daily patterns of serum leptin and food consumption. *Regul.Peptides* **92**:107-111.
- PUERTA, M., ABELENDA, M., ROCHA, M. y TRAYHURN, P. (2002). Effect of acute cold exposure on the expression of the adiponectin, resistin and leptin genes in rat white and brown adipose tissue. *Horm.Metab.Res.* **34**:629-634.

- QUIRÓS, M. y ALVARIÑO, J.M.R. (2000). Growth and survival of tench larvae under different feeding strategies. *J.Appl.Ichthyol.* **16**:32-35.
- RAFII-EL-IDRISSI, M., CALVO, J.R., GIORDANO, M. y GUERRERO, J.M. (1996). Specific binding of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin by rat spleen crude membranes: day-night variations, and effect of pinealectomy and continuous light exposure. *J.Pineal Res.* **20**:33-38.
- RAYNER, D.V., SIMON, E., DUNCAN, J.S. y TRAYHURN, P. (1998). Hyperleptinemia in mice induced by administration of tyrosine hydroxylase inhibitor  $\alpha$ -methyl-p-tyrosine. *FEBS Lett.* **429**:395-398.
- RANDALL, C.F., BROMAGE, M., THORPE, J.E., MILES, M.S. y MUIR, J.R. (1995). Melatonin rhythms in Atlantic salmon (*Salmo salar*) maintained under natural and out-phase photoperiods. *Gen.Comp.Physiol.* **98**:73-86.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T., RODRIGUES, E.L., VEIGA, M.L., EIRASS, A.C. y CAMPOS, B.E.S. (2003). Differential leukocyte counts in "dourado", *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840, from the Mogi-Guaçu river, Pirassununga, SP. *Braz.J.Biol.* **63**:517-525.
- RAUTHAN, J.V.S. y GROVER, S.P. (1994). Effect of some eco-physiological conditions on haematological values of hillstream fish *Barilius bendelisis* (Hamilton) of Doon Valley. *Uttar Pradesh.J.Zool.* **14**:147-150.
- RAWDING, R.S. y HUTCHISON, V.H. (1992). Influence of temperature and photoperiod on plasma melatonin in the mudpuppy, *Necturus maculosus*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **88**:364-374.
- REBOLLAR, P.G., UBILLA, E., PELETEIRO, J.B., AGAPITO, M.T. y ALVARIÑO, M.R. (1999). Determination of plasma melatonin levels by enzyme-linked immunosorbent assay (EIA) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and tench (*Tinca tinca* L.). *J.Physiol.Biochem.* **55**:341-348.
- RECIO, J., MEDIAVILLA, M.D., CARDINALI, D.P. y SÁNCHEZ-BARCELÓ, E.J. (1994). Pharmacological profile and diurnal rhythmicity of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in murine mammary tissue. *J.Pineal Res.* **16**:10-17.
- RECIO, J., PÉVET, P., VIVIEN-ROELS, B., MÍGUEZ, J.M. y MASSON-PÉVET, M. (1996). Daily and photoperiodic melatonin binding changes in the suprachiasmatic nuclei, paraventricular thalamic nuclei and pars tuberalis of the female Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *J.Biol.Rhythms* **11**:325-332.
- REDBURN, D.A. y MITCHELL, V.H. (1989). Darkness stimulates rapid synthesis and release of melatonin in rat retina. *Visual Neurosci.* **3**:391-403.
- REDDY, A.B., CRONIN, A.S., FORD, H. y EBLING, F.J. (1999). Seasonal regulation of food intake and body weight in the male Siberian hamsters: studies of hypothalamic orexin (hypocretin), neuropeptide Y (NPY) and pro-opiomelanocortin (POMC). *Eur.J.Neurosci.* **11**:3255-3264.
- REFINETTI, R. (2000). Circadian physiology. CRC Press, Florida, USA.
- ŘEHULKA, J. (1996). Blood parameters in common carp with spontaneous spring viremia (SVC). *Aquacul.Int.* **4**:175-182.
- ŘEHULKA, J. (1998). Blood indices of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aeromonas-induced ulcerous dermatitis. *Acta Vet.Brno* **67**:317-322.
- ŘEHULKA, J. y ADAMEC, V. (2004). Red blood cell indices for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) reared in cage and raceway culture. *Acta Vet.Brno* **73**:105-114.

- ŘEHULKA, J., MINARIK, B. y REHULKOVA, E. (2004). Red blood cell indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquacult. Res.* **35**:529-546.
- REIDY, S.P. y WEBER, J.M. (2000). Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* **125A**:285-297.
- REITER, R.J. (1984). Pineal indoles: production, secretion and actions: En: *Neuroendocrine perspectives* (Eds.: Muller, R.M. y McLeod, R.M.). Elsevier. Amsterdam.. pp. 347-377.
- REITER, R.J. (1991). Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocr.* **79**:C153-C159.
- REITER, R.J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* **49**:654-664.
- REPPERT, S.M. (1997). Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Rhythms* **12**:528-531.
- REPPERT, S.M. y WEAVER, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Ann. Rev. Physiol.* **63**:647-676.
- REPPERT, S.M., WEAVER, D.R., CASSONE, V.M., GODSON, C. y KOLAKOWSKI, L.F.JR. (1995). Melatonin receptors are in birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* **15**:1003-1015.
- REPPERT, S.M., WEAVER, D.R. y GODSON, C. (1996). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**:100-102.
- REUSS, S. y OLCESE, J. (1995). Neuropeptide Y: Distribution of immunoreactivity and quantitative analysis in diencephalic structures and cerebral cortex of Dwarf hamsters under different photoperiods. *Neuroendocrinology* **61**:337-347.
- RIBELAYGA, C., PÉVET, P. y SIMONNEAUX, V. (1997). Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res.* **777**:247-250.
- RICHARDS, M.P. y POCH, S.M. (2003). Molecular cloning and expression of the turkey leptin receptor gene. *Comp. Biochem. Physiol.* **136B**:833-847.
- RICHARDSON, R.D., BOSWELL, T., RAFFETY, B.D., SEELEY, R.J., WINGFIELD, J.C. y WOODS, S.C. (1995). NPY increases food intake in white-crowned sparrows: effect in short and long photoperiods. *Am. J. Physiol.* **268**:R1418-R1422.
- RILEY, L.G., HIRANO, T. y GRAU, E.G. (2002). Rat ghrelin stimulates growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zool. Sci.* **19**:797-800.
- RINGVALL, M., BERGLUND, M.M. y LARHAMMAR, D. (1997). Multiplicity of NPY receptors-cloning of a third distinct subtype in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res.* **241**:749-755.
- RIOS, F.S., KALININ, A.L. y RANTIN, F.T. (2002). The effects of long-term deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *J. Fish Biol.* **61**:85-95.
- RODRÍGUEZ, A.B., NOGALES, G., ORTEGA, E. y BARRIGA, C. (1998). Melatonin controls superoxide anion level: modulation of superoxide dismutase activity in ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* **24**:9-14.
- RODRÍGUEZ, A.B., TERRÓN, M.P., DURÁN, J., ORTEGA, E. y BARRIGA, C. (2001). Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* **31**:31-38.

- RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F.J., RENDÓN-UNCETA, M.C., SARASQUETE, C. y MUÑOZ-CUETO, J.A. (2000). Distribution of serotonin in the brain of the senegalense sole, *Solea senegalensis*: an immunohistochemical study. *J.Chem.Neuroanat.* **18**:103-115.
- RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F.J., RENDÓN-UNCETA, M.C., SARASQUETE, C. y MUÑOZ-CUETO, J.A. (2001). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of the Senegalenses sole (*Solea senegalensis*). *Anat.Rec.* **262**:227-237.
- ROUSSEAU, K., ATCHA, Z., CAGAMPANG, F.R.A., LE ROUZIC, P., STIRLAND, J.A., IVANOV, T.R., EBLING, F.J.P., KLINGESPOR, M. y LOUDON, A.S.I. (2002). Photoperiodic regulation of leptin resistance in the seasonally breeding Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* **143**:3083-3095.
- ROWLEY, A.F., HUNT, T.C., PAGE, M. y MAINWARING, G. (1988). Fish. En: *Vertebrate blood cells*. (Eds.: Rowley, A.F. y Ratcliffe, N.A.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 19-127.
- RUBIN, R.T., RHODES, M.E. y CZAMBEL, K. (2003). Plasma leptin supression by arginine vasopresin in normal women and men. *Life Sci.* **72**:1209-1220.
- RUIBAL, C., SOENGAS, J.L. y ALDEGUNDE, M. (2002). Brain serotonin and the control of food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of changes in plasma glucose levels. *J.Comp.Physiol.* **188A**:479-484.
- SAAD, M.F., DAMANI, S., GINGERICH, R.L., RIAD-GABRIEL, M.G., KHAN, A., BOYADJIAN, R., JINAGOUDA, S.D., EL-TAWIL, K., RUDE, R.K. y KAMDAR, V. (1997). Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **82**:579-584.
- SAAD, M.F., RIAD-GABRIEL, M.G., KHAN, A., SHARMA, A., MICHAEL, R., JINAGOUDA, S.D., BOYADJIAN, R. y STEIL, G.M. (1998). Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of gender and adiposity. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **83**:453-459.
- SAETHER, B.S., JOHNSEN, H.K. y JOBLING, M. (1996). Seasonal changes in food consumption and growth of Artic charr exposed to either simulated natural or a 12, 12 LD photoperiod at constant water temperature. *J.Fish Biol.* **48**:1113-1122.
- SAHU, A. (2004a). Minireview: a hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* **145**:2613-2620.
- SAHU, A. (2004b). Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front.Neuroendocrinol.* **24**:225-253.
- SAKATA, I., TANAKA, M., MATSUBARA, M., YAMAZAKI, M., TANI, S., HAYASHI, Y., KANGAWA, K. y SAKAI, T. (2002). Postnatal changes in ghrelin mRNA expression and in ghrelin-producing cells in the rat stomach. *J.Endocrinol.* **174**:463-471.
- SALADIN, R., DE VOS, P., GUERRE-MILLO, M., LETURKE, A., GIRARD, J., STAELS, B. y AUWERX, J. (1995). Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* **377**:527-529.
- SALANECK, E., FREDRIKSSON, R., LARSON, E.T., CONLON, J.M. y LARHAMMAR, D. (2001). A neuropeptide Y receptor Y1-subfamily gene from an agnathan, the European river lamprey. A potential ancestral gene. *Eur.J.Biochem.* **268**:6146-6154.

- SALIGAUT, C., BAILHACHE, T., SALBERT, G., BRETON, B. y JEGO, P. (1990). Dynamic characteristics of serotonin and dopamine metabolism in rainbow trout brain: a regional study using liquid chromatography with electrochemical detection. *Fish Physiol.Biochem.* **8**:199-205.
- SALIGAUT, C., BENNANI, S. y BAILHACHE, T. (1993). Catecholamine synthesis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain: modulation of tyrosine hydroxylase activity. *Fish Physiol.Biochem.* **11**:139-144.
- SALIGAUT, C., LINARD, B., BRETON, B., ANGLADE, I., BAILHACHE, T., KAH, O. y JEGO, P. (1999). Brain aminergic systems in salmonids and other teleost in relation to steroid feedback and gonadotropin release. *Aquaculture* **177**:13-20.
- SAMEJIMA, M., TAMOTSU, S., UCHIDA, K., MORIGUCHI, Y. y MORITA, Y. (1997). Melatonin excretion rhythms in the cultured pineal organ of the lamprey, *Lampetra japonica*. *Biol.Signals* **6**:241-246.
- SAMEJIMA, M., SHAVALI, S., TAMOTSU, S., UCHIDA, K., MORITA, Y. y FUKUDA, A. (2002). Light- and temperature-dependence of melatonin secretion rhythm in the pineal organ of lamprey, *Lampetra japonica*. *Japan J.Physiol.* **50**:437-442.
- SÁNCHEZ, J., OLIVER, P., PICÓ, C. y PALOU, A. (2004). Diurnal rhythms of leptin and ghrelin in the systemic circulation and in the gastric mucosa are related to food intake in rats. *Plügers Arch.* **448**:500-506.
- SÁNCHEZ-MUROS, M.J., GÓMEZ-MILÁN, E. y CARDENETE-HERNÁNDEZ, G. (2001). Caracterización de los ciclos diarios de actividad en algunas enzimas claves del metabolismo intermediario de *Sparus aurata* en primavera.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. y MADRID, J.A. (2001). Feeding anticipatory activity. En: *Food intake in fish*. (Eds.: Houlihan, D., Boujard, T. y Jobling, M.). Blackwell Science Ltd., Oxford. pp. 216-232.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. y TABATA, M. (1998). Circadian rhythms of demand-feeding and locomotor activity in rainbow trout. *J.Fish Biol.* **52**:255-267.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID, J.A. y ZAMORA, S. (1995a). Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. *J.Biol.Rhythms* **10**:256-266.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., ZAMORA, S. y MADRID, J.A. (1995b). Light-dark and food restriction cycles in sea bass: effect of conflicting zeitgebers on demand feeding rhythms. *Physiol.Behav.* **58**:705-714.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID, J.A., ZAMORA, S., IIGO, M., y TABATA, M. (1996). Demand feeding and locomotor circadian rhythms in goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiol.Behav.* **60**:665-674.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID, J.A., ZAMORA, S. y TABATA, M. (1997). Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J.Comp.Physiol.* **181A**:121-132.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., IIGO, M., y TABATA, M. (2000). Pinealectomy does not affect the entrainment to light nor the generation of the circadian demand-feeding rhythms of rainbow trout. *Physiol.Behav.* **69**:455-461.

- SANGORAM, A.M., SÁEZ, L., ANTOCH, M.P., GEKAKIS, N., STAKNIS, D., WHITELEY, A., FRUECHTE, E.M., VITATERNA, M.H., SHIMOMURA, K., KING, D.P., YOUNG, M.W., WEITZ, C.J. y TAKAHASHI, J.S. (1998). Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron* **21**:1101-1113.
- SANO, T. (1960). Haematological studies of the culture fishes in Japan. 3. Changes in blood constituents with growth of rainbow trout. *J.Tokyo Univ.Fish.* **46**:77-87.
- SCHNEIDER, J.E., BLUM, R.M. y WADE, G.N. (2000). Metabolic control of food intake and estrous cycles in Syrian hamsters: I. Plasma insulin and leptin. *Am.J.Physiol.* **278**:R476-R485.
- SCHOELLER, D.A., CELLA, L.K., SINHA, M.K., y CARO, J.F. (1997). Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J.Clin.Invest.* **100**:1882-1887.
- SCHWALME, K., MACKAY, W.C. y CLANDININ, M.T. (1993). Seasonal dynamics of fatty acid composition in female northern pike (*Exos lucius* L.). *J.Comp.Physiol.* **163B**:277-287.
- SCHWARTZ, M.W., SIPOLS, A.J., GRUBIN, C.E. y BASKIN, D.G. (1993). Differential effect of fasting on hypothalamic expression of genes encoding neuropeptide Y, galanin, and glutamic acid decarboxylase. *Brain Res.Bull.* **31**:361-367.
- SCHWARTZ, M.W., WOODS, S.C., PORTE, D.JR., SEELEY, R.J. y BASKIN, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**:661-671.
- SEDDON, W.L. y PROSSER, C.L. (1997). Seasonal variations in the temperature acclimation response of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Physiol.Zool.* **70**:33-44.
- SELMAOUI, B., OGUINE, L. y THIBAUT, L. (2001). Food access schedule and diet composition alter rhythmicity of serum melatonin and pineal NAT activity. *Physiol.Behav.* **74**:449-455.
- SENTHILKUMARAN, B. y JOY, K.P. (1993). Annual variations in hypothalamic serotonin and monoamine oxidase in the catfish *Heteropneustes fossilis* with a note on brain regional differences of day-night variations in gonadal preparatory phase. *Gen.Comp.Endocrinol.* **90**:372-382.
- SENTHILKUMARAN, B. y JOY, K.P. (1995). Changes in hypothalamic catecholamines, dopamine- $\beta$ -hydroxylase, and phenylethanolamine-N-methyltransferase in the catfish *Heteropneustes fossilis* in relation to season, raised photoperiod and temperature, and estradiol-17- $\beta$  replacement. *Gen.Comp.Endocrinol.* **97**:121-134.
- SENTHILKUMARAN, B. y JOY, K.P. (1996). Effects of administration of some monoamine-synthesis blockers and precursors on ovariectomy-induced rise in plasma gonadotropin II in the catfish (*Heteropneustes fossilis*). *Gen.Comp.Endocrinol.* **101**:220-226.
- SHERIDAN, M.A. (1989). Alterations in lipid metabolism accompanying smoltification and sea water adaptation of salmonid fish. *Aquaculture* **82**:191-203.
- SHERIDAN, M.A. y MOMMSEN, T.P. (1991). Effects of nutritional state on *in vivo* lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **81**:473-483.
- SHI, Q., ANDO, H., COON, S.L., SATO, S., BAN, M. y URANO, A. (2004). Embryonic and post-embryonic expression of arylalkylamine N-acetyltransferase and melatonin receptor

- genes in the eye and brain of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Gen.Comp.Endocrinol.* **136**:311-321.
- SHIYA, T., NAKAZATO, M., MIZUTA, M., DATE, Y., MONDAL, M.S., TANAKA, M., NOZOE, S.I., HOSADA, H., KANGAWA, K. y MATSUKURA, S. (2002). Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **87**:240-244.
- SHIMENO, S. (1982). Effect of starvation and refeeding on carbohydrate metabolism in yellowtail. En: *Studies on carbohydrate metabolism in fish*. (Ed.: Balkema, A.A.). Rotterdam, New Delhi. pp. 72-90.
- SHIMIZU, H., SHIMOMURA, Y., NAKANISHI, Y., FUTAWATARI, T., OHTANI, K., SATO, N. y MORI, M. (1997). Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J.Endocrinol.* **154**:285-292.
- SHINA, M.K., OHANNESIAN, J.P., HEIMAN, M.L., KRIAUCIUNAS, A., STEPHENS, T.W., MAGOSIN, S., MARCO, C. y CARO, J.F. (1996). Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin dependent diabetes mellitus subjects. *J.Clin.Invest.* **97**:1344-1347.
- SHINOHARA, K. e INOUE, S.I.T. (1995). Photic information coded by vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y. *Neurosci.Biohav.Rev.* **19**:349-352.
- SHINOHARA, K., TOMINAGA, K. e INOUE, S.I.T. (1993). Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the suprachiasmatic nucleus of the rat: daily variations of vasoactive intestinal polypeptide, gastrin-releasing peptide, and neuropeptide Y. *J.Neurosci.* **13**:793-800.
- SHINTANI, M., OGAWA, Y., EBIHARA, K., AIZAWA-ABE, M., MIYANAGA, F., TAKAYA, K., HAYASHI, T., INOUE, G., HOSODA, K., KOJIMA, M., KANGAWA, K. y NAKAO, K. (2001). Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* **50**:227-232.
- SHIRAISHI, T. (1991). Noradrenergic neurons modulate lateral hypothalamic chemical and electrical stimulation-induced feeding by satiated rats. *Brain Res.Bull.* **27**:347-351.
- SHIU, S.Y.W., POON, A.M.S., BROWN, G.M. y PANG, S.F. (1998). Receptors in reproductive tissues: evidence for the multiple sites of melatonin action. INABIS'98-5<sup>th</sup>. Internet World Congress on Biomedical Sciences at McMaster University, Canada, Dec 7-16<sup>th</sup>.
- SIERRA, A., SÁEZ-ROYUELA, M., CARRAL, J.M., CELADA, J.D., GAUDIOSO, V.R., MUÑOZ, C. y PÉREZ, J.R. (1995). Response of tench [*Tinca tinca* (L.)] fed five different diets under intensive conditions. *Pol.Arch.Hydrobiol.* **42**:207-210.
- SILVERSTEIN, J.T., BREININGER, J., BASKIN, D.G. y PLISetskaya, E.M. (1998). Neuropeptide Y-like gene expression in the salmon brain increases with fasting. *Gen.Comp.Endocrinol.* **110**:157-165.
- SIMANSKY, K.J. (1996). Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav.Brain Res.* **73**:37-42.

- SIUCIAK, J.A., GAMACHE, P.H. y DUBOCOVICH, M.L. (1992). Monoamines and their precursors and metabolites in the chicken brain, pineal, and retina: regional distribution and day/night variations. *J.Neurochem.* **58**:722-729.
- SLOLEY, D.B., HICKIE, B.E., DIXON, D.G., DOWNER, R.G.H. y MARTIN, R.J. (1986). The effects of sodium pentachlorophenate, diet and sampling procedure on amine and tryptophan concentrations in the brain of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J.Fish Biol.* **28**:267-277.
- SLOLEY, D.B., TRUDEAU, V.L., DULKA, J.G. y PETER, R.E. (1991). Selective depletion of dopamine in the goldfish pituitary caused by domperidone. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **69**:776-781.
- SLOLEY, D.B., TRUDEAU, V.L. y PETER, R.E. (1992). Dopamine catabolism in goldfish (*Carassius auratus*) brain and pituitary: lack of influence of catecholstrogens on dopamine catabolism and gonadotropin secretion. *J.Exp.Zool.* **263**:398-405.
- SMIALOWSKA, M. y LEGUTKO, B. (1991). Influence of imipramine on neuropeptide Y immunoreactivity in the rat brain. *Neuroscience* **41**:767-771.
- SMIT, G.L., HATTINGH, J. y FERREIRA, J.T. (1981). The physiological response of blood during thermal adaptation in three freshwater fish species. *J.Fish Biol.* **19**:147-160.
- SMITH, R.G., PONG, S.S., HICKEY, G.J., JACKS, T.M., CHENG, K., LEONARD, R.J., COHEN, C.J., ARENA, J.P., CHANG, C.H., DRISKO, J.E., WYVRATT, M.J.JR, FISHER, M.H., NARGUND, R.P. y PATCHETT, A.A. (1996). Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland. *Recent Prog.Horm.* **51**:261-268.
- SMITH, B.K., BERTHOLD, H.R., YORK, D.A. y BRAY, A. (1997). Differential effects of baseline macronutrient preferences on macronutrient selection after galanin, NPY, and overnight fast. *Peptides* **18**:207-211.
- SOHN, E.H., WOLDEN-HANSON, T. y MATSUMOTO, A.M. (2002). Testosterone (T)-induced changes in arcuate nucleus cocaine-amphetamine-regulated transcript and NPY mRNA are attenuated in old compared to young male brown Norway rats: contribution of T to age-related changes in cocaine-amphetamine-regulated transcript and NPY gene expression. *Endocrinology* **143**:954-963.
- SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. (1979). Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Ediciones Blume, Madrid.
- SONG, Y., CHAN, C.W.Y., BROWN, G.M., PANG, S.F. y SILVERMAN, M. (1997). Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 KDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. *FASEB J.* **11**:93-100.
- SPIELER, R.E. (1992). Feeding-entrained circadian rhythms in fishes. En: *Rhythms in fishes*. (Ed.: Ali, M.A.). Plenum Press, New York. pp. 137-148.
- STANLEY, B.G., DANIEL, D.R., CHIN, A.S. y LEIBOWITZ, S.F. (1985). Paraventricular nucleus injection of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides* **6**:1205-1211.
- STARBACK, P., LUNDELL, I., FREDRIKSSON, R., BERGLUND, M.M., YAN, Y.L., WRAITH, A., SODERBERG, C., POSTLETHWAIT, J.H. y LARHAMMAR, D. (1999). Neuropeptide Y receptor subtype with



- unique properties cloned in the zebrafish: the zYa receptor. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **70**:242-252.
- STEFFENS, W. (1995). The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. *Pol.Arch.Hydrobiol.* **42**:161-180.
- STEINLECHNER, S., BUCHBERGER, A. y HELDMAIER, G. (1987). Circadian rhythms of pineal N-acetyltransferase activity in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*, in response to seasonal changes of natural photoperiod. *J.Comp.Physiol.* **160**:593-597.
- STENFORS, C., HELLMAN, U. y SILBERRING, J. (1997). Characterization of endogenous neuropeptide Y in rat hippocampus and its metabolism by nanospray mass spectrometry. *J.Biol.Chem.* **272**:5747-5751.
- STEPHENS, T.W., BASINSKI, M., BRISTOW, P.K., BUE-VALLESKEY, J.M., BURGETT, S.G., CRAFT, L., HALE, J., HOFFMANN, J., HSIUNG, H.M., KRIAUCIUNAS, A., MACKELLAR, W., ROSTECK, P.R.JR., SCHONER, B., SMITH, J.D., TINSLEY, F.C., ZHANG, X.Y. y HEIMAN, M. (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* **377**:530-532.
- STEUKE, E.E. y ATHERTON, C.R. (1965). Use of microhaematocrit values to sex largemouth bass. *Progress.Fish Cultur.* **27**:87-89.
- STOKKAN, K.A., YAMAZAKI, S., TEI, H., SAKATI, Y., y MENAKER, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* **291**:490-493.
- STRICKER-KRONGRAD, A., KOZAC, R., BURLET, C., NICOLAS, J.P. y BECK, B. (1997). Physiological regulation of hypothalamic neuropeptide Y release in lean and obese rats. *Am.J.Physiol.* **273**:R2112-R2116.
- STRICKER-KRONGRAD, A., CUMIN, F., BURLET, C. y BECK, B. (1998). Hypothalamic neuropeptide Y and plasma leptin after long-term high-fat feeding in the rat. *Neurosci.Lett.* **254**:157-160.
- SUÁREZ, R.K. y MOMMSEN, T.P. (1987). Gluconeogenesis in teleost fishes. *Can.J.Zool.* **65**:1869-1882.
- SUGINO, T., HASEGAWA, Y., KIKKAWA, Y., YAMAMURA, J., YAMAGASHI, M., KUROSE, Y., KOJIMA, M., KANGAWA, Y. y TERASHIMA, Y. (2002a). A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a schedule meal-fed sheep. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **295**:255-260.
- SUGINO, T., YAMAMURA, J., YAMAGASHI, M., OGURA, A., HAYASHI, R., KUROSE, Y., KOJIMA, M., KANGAWA, Y., HASEGAWA, Y. y TERASHIMA, Y. (2002b). A transient surge of ghrelin secretion before feeding is modified by different feeding regimens in sheep. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **298**:785-788.
- SUNDBY, A., HEMRE, G.-I., BORREBAEK, B., CHRISTOPHERSEN, B. y BLOM, A.K. (1991). Insulin and glucagon family peptides in relation to activities of hepatic hexokinase and other enzymes in fed and starved Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Comp.Biochem.Physiol.* **100B**:467-470.
- SVETINA, A., MATAŠIN, Ž., TOFANT, A., VUČEMILO, M. y FIJAN, N. (2002). Haematology and some blood chemical parameters of young carp till the age of three years. *Acta Vet.Hun.* **50**:459-467.

- SVOBODOBÁ, Z., KOLÁŘOVÁ, J. y FLAJŠHANS, M. (1998). The first finding of the differences in complete blood count between diploid and triploid Tench., *Tinca tinca* L. *Acta Vet.Brno* **67**:243-248.
- SVOBODA, M., KOUŘIL, J., HAMÁČKOVÁ, J., KALÁB, P., SAVINA, L., SVOBODOVÁ, Z. y VYKUSOVÁ, B. (2001). Biochemical profile of blood plasma of tench (*Tinca tinca* L.) during pre- and postspawning period. *Acta Vet.Brno* **70**:259-268.
- TABATA, M. (1992). Photoreceptor organs and locomotor activity in fishes. En: *Rhythms in fishes*. (Ed.:Ali, M.A.), Plenum Press, New York. pp. 223-234.
- TABATA, M., MINH-NYO, M. y OGURI, M. (1988). Involvement of retinal and extraretinal photoreceptors in the mediation of nocturnal locomotor activity rhythms in the catfish, *Silurus asotus*. *Exp.Biol.* **47**:219-225.
- TACHIBANA, T., TAZAWA, M. y SUGAHARA, K. (2001). Feeding increases 5-hydroxytryptamine and norepinephrine within the hypothalamus of chicks. *Comp.Biochem.Physiol.* **130A**:715-722.
- TAKAHASHI, J.S., MURAKAMI, N., NIKAIIDO, S.S., PRATT, B.L. y ROBERTSON, L.M. (1989). The avian pineal, a vertebrate model system of a circadian oscillator: cellular regulation of circadian rhythms by light, second messengers, and macromolecular synthesis. *Recent Prog.Horm.Res.* **45**:279-352.
- TARTAGLIA, L.A., DEMBSKI, M., WENG, X., DENG, N.H., CULPEPPER, J., DEVOS, R., RICHARDS, G.J., CAMPFIELD, L.A., CLARK, F.T., DEEDS, J., MUIR, C., SANKER, S., MORIARTY, A., MOORE, K.J., SMUTKO, J.S., MAYS, G.G., WOOLF, E.A., MONROE, C.A. y TEPPER, R.I. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, ob-r. *Cell* **83**:1263-1271.
- TATEMOTO, K. (1982). Neuropeptide Y: complete aminoacid sequence of the brain peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **79**:5485-5489.
- TENA-SEMPERE, M., BARREIRO, M.L., GONZÁLES, L.C., GAYTÁN, F., ZHANG, F.P., CAMINOS, J.E., PINILLA, L., CASANUEVA, F.F., DIÉGUEZ, C. y AGUILAR, E. (2002). Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* **143**:717-725.
- THIBAUT, L. (1992). Influence of feeding paradigm in rats on temporal pattern of: II. Brain serotonergic and catecholaminergic systems. *Chronobiol.Int.* **9**:19-34.
- TILDEN, A.R. y HUTCHISON, V.H. (1993). Influence of photoperiod and temperature on serum melatonin in the diamondback water snake, *Nerodia rhombifera*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **92**:347-354.
- TOLLE, V., BASSANT, M.H., ZIZZARI, P., POINDESSOUS-JAZAT, F., TOMASSETO, C., EPELBAUM, J. y BLUET-PAJOT, M.T. (2002). Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns. *Endocrinology* **143**:1353-1361.
- TOSHINAI, K., MONDAI, M.S., NAKAZATO, M., DATE, Y., MURAKAMI, N., KOJIMA, M., KANGAWA, K. y MATSUKURA, S. (2001). Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **281**:1220-1225.
- TOSHINAI, K., DATE, Y., MURAKAMI, N., SHIMADA, M., MONDAL, M.S., SHIMBARA, T., GUAN, J.L., WANG, Q.P., FUNAHASHI, H., SAKURAI, T., SHIODA, S., MATSUKURA, S., KANGAWA, K. y

- NAKAZATO, M. (2003). Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* **144**:1506-1512.
- TOSINI, G. (2000). Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals. *Chronobiol.Int.* **17**:599-612.
- TOSINI, G. y MENAKER, M. (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* **272**:418-421.
- TOURNIER, B.B., MENET, J.S., DARDENTE, H., POIREL, V.J., MALAN, A., MASSON-PÉVET, M. y VUILLEZ, P.P. (2003). Photoperiod differentially regulates clock genes expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience* **118**: 317-322.
- TRANULIS, M.A., CHRISTOPHERSEN, B. y BLOM, A.K. (1991). Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effects of starvation and temperature variation. *Comp.Biochem.Physiol.* **99B**:687-691.
- TRAVERSO, J.M., RAVAGLIA, M.A., VISSIO, P.G., MAGGESE, M.C. y PAZ, D.A. (2003). Localization of Neuropeptide Y-like immunoreactive structures in the brain of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atheriniformes). *Anat.Histol.Embryol.* **32**:29-35.
- TRUDEAU, V.L. (1997). Neuroendocrine regulation of gonadotrophin-II release and gonadal growth on the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev.Reprod.* **2**:55-68.
- TRUDEAU, V.L. y PETER, R.E. (1995). Functional interaction between neuroendocrine systems regulating GTH II release. En: *Reproductive physiology of fish*. (Eds.: Goetz, F.W. y Thomas, P.). Austin Fish Symposium 95. pp. 44-48.
- TRUDEAU, V.L., SLOLEY, B.D. y PETER, R.E. (1993a). Norepinephrine turnover in goldfish brain is modulated by sex steroids and GABA. *Brain Res.* **624**:29-34.
- TRUDEAU, V.L., SLOLEY, B.D., WONG, A.O.L. y PETER, R.E. (1993b). Interactions of gonadal steroids with brain dopamine and gonadotropin-releasing hormone in the control of gonadotropin II secretion in the goldfish. *Gen.Comp.Endocrinol.* **89**:39-50.
- TSAL, C.L. y WANG, L.H. (1997). Effects of thermal acclimation on the neurotransmitters, serotonin and norepinephrine in the discrete brain of male and female tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Neurosci. Lett.* **233**:77-80.
- TSCHÖP, M., SMILEY, D.L. y HEIMAN, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**:908-913.
- TSCHÖP, M., WEYER, C.H., TATARANNI, P.A., DEVANARAYAN, V., RAVUSSIN, E. y HEIMAN, M.L. (2001a). Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* **50**:707-709.
- TSCHÖP, M., SMILEY, D.L. y HEIMAN, M.L. (2001b). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**:908-913.
- TVEINTEN, H., JOHNSEN, H.K. y JOBLING, M. (1996). Influence of maturity status on the annual cycles of feeding and growth of Arctic charr reared at constant temperature. *J.Fish Biol.* **48**:910-924.
- UNDERWOOD, H. (1990). The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia* **46**:120-128.

- UNDERWOOD, H. y SIOPES, T. (1985). Melatonin rhythms in quail: regulation by photoperiod and circadian pacemaker. *J.Pineal Res.* **2**:133-143.
- UNDERWOOD, H. y CALABAN, M. (1987). Pineal melatonin rhythms in the lizard *Anolis carolinensis*: 1. Response to light and temperature cycles. *J.Biol.Rhythms* **2**:179-193.
- UNDERWOOD, H., STEELE, C.T. y ZIVKOVIC, B. (2001). Circadian organization and the role of the pineal in birds. *Microsc.Res.Tech.* **53**:48-62.
- UNNIAPPAN, S., LIN, X., CERVINI, L., RIVIER, J., KAIYA, K., KANGAWA, R.E. y PETER, R.E. (2002). Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology* **143**:4143-4146.
- UNNIAPPAN, S., CANOSA, L.F. y PETER, R.E. (2004). Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections. *Neuroendocrinology* **79**:100-108.
- URBAN, J.H., BAUER-DANTOIN, A.C. y LEVINE, J.E. (1993). Neuropeptide Y gene expresión in the arcuate nucleus: sexual dimorphism and modulation by testosterone. *Endocrinology* **132**:139-145.
- VALENCIANO, A.I. (1998). Triptófano hidroxilasa en los fotorreceptores de la retina de *Xenopus laevis*: rRegulación de la expresión y la actividad enzimática por el fotoperiodo y mensajeros intracelulares y extracelulares. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- VALENCIANO, A.I., ALONSO-GÓMEZ, A.L., DE PEDRO, N., ALONSO-BEDATE, M. y DELGADO, M.J. (1994). Serotonin N-acetyltransferase activity as target for temperature in the regulation of melatonin production by frog retina. *Pflügers Arch.* **429**:153-9.
- VALENCIANO, A.I., ALONSO-GÓMEZ, A.L., ALONSO-BEDATE, M. y DELGADO, M.J. (1997). Effect of constant and fluctuating temperature on melatonin production by eyecups from *Rana perezi*. *J.Comp.Physiol.* **167B**:221-228.
- VALENZUELA, A., OYARZÚN, C. y SILVA, V. (2003). Células sanguíneas de *Schoederichthys chilensis* (Guichenot 1884) (Elasmobranchii, Scyliorhinidae): la serie blanca. *Gayana* **67**:130-136.
- VALLARINO, M., TRANCHAND-BUNEL, D., THOUMAS, J.L., MASINI, M.A., CONLON, J.M., FOURNIER, A. y PELLETIER, G. (1995). Neuropeptide tyrosine in the brain of the african lungfish, *Protopterus annectens*: immunohistochemical localization and biochemical characterization. *J.Comp.Neurol.* **356**:537-551.
- VALLARINO, M., MASINI, M.A., TABUCCHI, M., MATHIEN, M. y VAUDRY, H. (1998). Autoradiographic distribution of neuropeptide tyrosine binding sites in the brain of the African lungfish, *Protopterus annectens*. *Neurosci.Lett.* **254**:5-8.
- VANEČEK, J. (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol.Rev.* **78**:687-721.
- VERA, M.L., LÓPEZ-OLMEDA J.M., BAYARRI M.J., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2004a). Influence of light intensity on plasma melatonin and locomotor activity rhythms in tench. *Physiol.Behav.* (en prensa).
- VERA, M.L., GUIJARRO, A.I., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., DELGADO, M.J., DE PEDRO, N. (2004b). Influence of total and fat fasting on leptin, ghrelin and cortisol plasma levels and

- hypothalamic content of neuropeptide Y (NPY) in sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo* L.). Aquaculture Europe'2004. Biotechnologies for quality. Barcelona, October, 20-23.
- VIEIRA, R., MÍGUEZ, J., LEMA, M. y ALDEGUNDE, M. (1992). Pineal and plasma melatonin determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Biochem.* **205**:300-305.
- VILLARREAL, C.A., TORPE, J.E. y MILES, M.S. (1988). Influence of photoperiod on growth changes in juvenile Atlantic salmon, L. *J.Fish Biol.* **33**:15-30.
- VISWANATHAN, M., LAITINEN, J.T. y SAAVEDRA, J.M. (1990). Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**:6200-6203.
- VIVIEN-ROELS, B., ARENDT, J. y BRADTKE, J. (1979). Circadian and circannual fluctuations of pineal indoleamines (serotonin and melatonin) in *Tetsudo hermanni* Gmelin (Reptilia, Chelonia). *Gen.Comp.Endocrinol.* **37**:197-210.
- VIVIEN-ROELS, B., PÉVET, P. y CLAUSTRAT, B. (1988). Pineal and circulating melatonin rhythm in the box turtle, *Terrapene carolina triunguis*: effect of photoperiod, light pulse, and environmental temperature. *Gen.Comp.Endocrinol.* **69**:163-173.
- VIVIEN-ROELS, B., PÉVET, P., MASSON-PÉVET, M. y CANGUILHEM, B. (1992). Seasonal variations of the daily rhythm of pineal gland and/or circulating melatonin and 5-methoxytryptophol concentrations in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **86**:239-247.
- VIVIEN-ROELS, B., PITROSKY, B., ZITOUNI, M., MALAN, A., CANGUILHEM, B., BONN, D. y PÉVET, P. (1997). Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **106**:85-94.
- VOLKOFF, H. y PETER, R.E. (2001). Characterization of two forms of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide precursors in goldfish: molecular cloning and distribution, modulation of expression by nutritional status, and interactions with leptin. *Endocrinology* **142**:5076-5088.
- VOLKOFF, H., EYLKELBOSH, A.J. y PETER, R.E. (2003). Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecistokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Res.* **972**:90-109.
- VON GALL, C., STEHLE, J.H. y WEAVER, D.R. (2002). Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell.Tissue Res.* **309**:151-162.
- VON LUKOWICZ, M., TAMAS, G. y HORVATH, I. (1986). Aquaculture of tench. En: *Aquaculture of Cyprinids* (Eds.: Billard, R. y Marcel, J.). INRA. Paris, pp. 357-367.
- VOSILENĖ, M.Z. y KAZLAUSKIENĖ, N. (1999). Alterations in fish health state parameters after exposure to different stressors. *Acta Zool.Lit.Hydrobiol.* **9**:83-94.
- WABITSCH, M., BLUM, W.F., RASCHER, W. y HAUNER, H. (1997). Studies on the regulation of leptin expression using in vitro differentiated human adipocytes. En: *Leptin – The voice of adipose tissue*. (Eds.: Blum, W.F., Kiess, W. y Rascher, W.). J&J Ed. Johann Ambrosius Barth Verlag. pp. 102-109.

- WALLAERT, C. y BABIN, P.J. (1994). Age-related, sex-related and seasonal changes of plasma lipoprotein concentration in trout. *J.Lipid Res.* **35**:1619-1633.
- WAN, Q., MAN, H.Y., LIU, F., BRAUNTON, J., NIZNIK, H.B., PANG, S.F., BROWN, G.M. y WANG, Y.T. (1999). Differential modulation of GABA<sub>A</sub> receptor function by Mel<sub>1a</sub> and Mel<sub>1b</sub> receptors. *Nat.Neurosci.* **2**:401-403.
- WANG, G., LEE, H.M., ENGLANDER, E. W. y GREELEY, G.H.JR. (2002a). Ghrelin-not just another stomach hormone. *Regul.Peptides* **105**:75-81.
- WANG, L., SAINT-PIERRE, D.H. y TACHE, Y. (2002b). Peripheral ghrelin selectively increase Fos expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate. *Neurosci.Lett.* **325**:47-51.
- WEAVER, D.R. (1999). Melatonin and circadian rhythmicity in vertebrates: physiological roles and pharmacological effects. En: *Neurobiology of sleep and circadian rhythms—lung biology in health and disease*. (Eds.: Turek, F.W. y Zee, P.). Marcel Dekker, New York. pp. 197-262.
- WEIL, C., LEBAIL, P.Y., SABIN, N. y LE GRAC, F. (2003). In vitro action of leptin on FSH and LH production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different steps of the sexual cycle. *Gen.Comp.Endocrinol.* **130**:2-12.
- WELLMAN, P.J., DAVIES, B.T., MORIEN, A. y MCMAHON, L. (1993). Modulation of feeding by hypothalamic paraventricular nucleus  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *Life Sci.* **53**:669-679.
- WESEMANN, W., WEINER, N. y WIESEL, D. (1989). Chronobiological aspects of the cerebral serotonergic system. En: *Chronopharmacology* (Ed.: Lemmer, B.). Marcel Dekker, New York. pp.207-238.
- WESTERINK, B.H.C., TEISMAN, A. y DE VRIES, J.B. (1994). Increase in dopamine release from the nucleus accumbens in response to feeding: a model to study interactions between drugs and naturally activated dopaminergic neurons in the rat brain. *Arch.Pharmacol.* **349**:230-235.
- WESTERINK, B.H.C., KWINT, H.F. y DE VRIES, J.B. (1997). Eating-induced dopamine release from mesolimbic neurons is mediated by NMDA receptors in the ventral tegmental area: a dual-probe microdialysis study. *J.Neurochem.* **69**:662-668.
- WHITE, A., FLETCHER, T.C. y POPE, J.A. (1986). Seasonal changes in serum lipid composition of the plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J.Fish Physiol.* **28**:595-606.
- WHITE, B.D. y MARTIN, R.J. (1997). Evidence for a central mechanism of obesity in the Zucker rat: role of neuropeptide Y and leptin. *Soc.Exp.Biol.Med.* **214**:222-231.
- WHITMORE, D., FOULKES, N.S., STRAHLE, U. y SASSONE-CORSI, P. (1998). Zebrafish clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat.Neurosci.* **1**:701-707.
- WHITMORE, D., FOULKES, N.S. y SASSONE-CORSI, P. (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* **404**:87-91.
- WIECHMANN, A.F. (1986). Melatonin: parallels in pineal gland and retina. *Exp.Eye Res.* **42**:507-527.
- WIECHMANN, A.F. y WIRSIG-WIECHMANN, C.R. (1991). Localization and quantification of high-affinity melatonin binding sites in *Rana pipiens* retina. *J.Pineal Res.* **10**:174-179.
- WIELAND, H.A., HAMILTON, B.S., KRIST, B. y DOODS, H.N. (2000). The role of NPY in metabolic homeostasis: implications for obesity therapy. *Exp.Opin.Invest.Drugs.* **9**:1327-1346.

- WILLIAMS, G., BING, C., CAI, X.J., HARROLD, J.A., KING, P.J. y LIU, X.H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol.Behav.* **74**:683-701.
- WINBERG, S. y NILSSON, G.E. (1993). Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comp.Biochem.Physiol.* **106C**:597-614.
- WINBERG, S., CARTER, C.G., MCCARTHY, I.D., HE, Z., NILSSON, G.E. y HOULIHAN, D.F. (1993a). Correlation between feeding hierarchy position and brain serotonergic activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J.Exp.Biol.* **179**:197-211.
- WINBERG, S., MYRBERG, A.A.JR. y NILSSON, G.E. (1993b). Predator exposure alters brain serotonin metabolism in bicolor damselfish. *Neuroreport* **4**:399-402.
- WINBERG, S., WINBERG, Y. y FERNALD, R.D. (1997). Effect of social rank on brain monoaminergic activity in a cichlid fish. *Brain Behav.Evol.* **49**:230-236.
- WOLNICKI, J. y GÓRNY, W. (1995). Suitability of two commercial dry diets for intensive rearing of larval tench (*Tinca tinca* L.) under controlled conditions. *Aquaculture* **129**:256-258.
- WOLNICKI, J. y MYSZKOWSKI, L. (1998). Evaluation of four commercial diets for intensive production of tench *Tinca tinca* L. juveniles under controlled conditions. *Pol.Arch.Hydrobiol.* **45**:453-458.
- WOLNICKI, J., MYSZKOWSKI, L. y KAMIŃSKI, R. (2003). Effect of supplementation of a dry feed with natural food, condition and size distribution of juvenile tench *Tinca tinca* L. *J.Appl.Ichtiol.* **19**:157-160.
- WOO, N.Y.S. y CHEUNG, S.I. (1981). Metabolic effects of starvation in snakehead, *Ophiocephalus maculatus*. *Comp.Biochem.Physiol.* **67A**:461-465.
- WOO, N.Y.S. y MURAT, J.C. (1981). Studies on the biology of red sea bream *Chrysophrys major*-IV. Metabolic response to starvation at low temperature. *Comp.Biochem.Physiol.* **69A**:461-465.
- WREN, A.M., SMALL, C.J., WARD, H.L., MURPHY, K.G., DAKIN, C.L., TAHERI, S., KENNEDY, A.R., ROBERTS, G.H., MORGAN, D.G., GHATEI, M.A. y BLOOM, S.R. (2000). The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* **141**:4325-4328.
- WREN, A.M., SMALL, C.J., ABBOTT, C.R., DHILLO, W.S., SEAL, L.J., COHEN, M.A., BATTERHAM, R.L., TAHERI, S., STANLEY, S.A., GHATEI, M.A. y BLOOM, S.R. (2001). Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* **50**:2540-2547.
- XU, B., KALRA, P.S., FARMERIE, W.G. y KALRA, S.P. (1999). Daily changes in hypothalamic gene expression of neuropeptide Y, galanin, proopiomelanocortin, and adipocyte gene expression and secretion: effect of food restriction. *Endocrinology* **140**:2868-2875.
- YADA, T. y NAKANISHI, T. (2002). Interaction between endocrine and immune systems in fish. *Int.Rev.Cytol.* **220**:35-92.
- YAGHOUBIAN, S., FILOSA, M.F. y YOUSON, J.H. (2001). Proteins immunoreactive with antibody against a human leptin fragment are found in serum and tissues of the sea lamprey *Petromyzon marinus* L. *Comp.Biochem.Physiol.* **129 B**:777-785.

- YAMADA, J., SUGIMOTO, Y. y UJIKAWA, M. (1999). The serotonin precursor 5-hydroxytryptophan elevates serum leptin levels in mice. *Eur.J.Pharmacol.* **383**:49-51.
- YAMADA, J., UJIKAWA, M. y SUGIMOTO, Y. (2000). Serum leptin levels after central and systemic injection of a serotonin precursor, 5-hydroxytryptophan, in mice. *Eur.J.Pharmacol.* **406**:159-162.
- YAMAZAKI, S., NUMANO, R., ABE, M., HIDA, A., TAKAHASHI, R., UEDA, M., BLOCK, G.D., SAKAKI, Y., MENAKER, M. y TEI, H. (2000). Reseting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**:682-685.
- YANG, Z.J., KOSEKI, M., MEGUID, M.M. y LAVIANO, A. (1996). Eating related increase of dopamine concentration in the LHA with oronasal stimulation. *Am.J.Physiol.* **270**:R315-R318.
- YANG, Z.J., MEGUID, M.M., CHAI, J.K., CHEN, C. y OLER, A. (1997). Bilateral hypothalamic dopamine infusion in male Zucker rat suppress feeding due to reduced meal size. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **58**:631-635.
- YARON, Z. (1995). Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carps. *Aquaculture* **129**:49-73.
- YOSHIHARA, T., HONMA, S. y HONMA, K.I. (1996). Effects of restricted daily feeding on neuropeptide Y release in the rat paraventricular nucleus. *Endocrinol.Metab.* **33**:E589-E595.
- YOUNG, M.W. y KAY, S.A. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nature Rev.Genet.* **2**:702-715.
- YUAN, H. y PANG, S.F. (1992). [<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the chicken brain: diurnal variation and effects of melatonin injection or pinealectomy. *Biol.Signals* **1**:208-218.
- ZACHMANN, A., KNIJFF, S.C.M., BOLLIET, V. y ALI, M.A. (1991). Effects of temperature cycles and photoperiod on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of a teleost (*Catostomus commersoni*) in vitro. *Neuroendocrinol.Lett.* **13**:325-330.
- ZACHMANN, A., FALCÓN, J., KNIJFF, S.C.M., BOLLIET, V. y ALI, M.A. (1992a). Effects of photoperiod and temperature on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*) in vitro. *Gen.Comp.Endocrinol.* **86**:26-33.
- ZACHMANN, A., KNIJFF, S.C.M., ALI, M.A. y ANCTIL, M. (1992b). Effects of photoperiod and different intensities of light exposure on melatonin levels in the blood, pineal organ and retina of the brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Can.J.Zool.* **70**:25-29.
- ZACHMANN, A., KNIJFF, S.C.M., BOLLIET, V. y ALI, M.A. (1992c). Effects of temperature cycles and photoperiod on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of a teleost (*Catostomus commersoni*) in vitro. *Neuroendocrinol.Lett.* **13**:325-330.
- ZACHMANN, A., ALI, M.A. y FALCÓN, J. (1992d). Melatonin and its effects in fishes: an overview. En: *Rhythms in fishes*. (Ed.: Ali, M.A.). Plenum Press, New York. pp. 149-165.
- ZAPATA, A.G., VARAS, A. y TORROBA, M. (1992). Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunol.Today* **13**:142-147.
- ZATZ, M., LANGE, G.D. y ROLLAG, M.D. (1994). GAT does changing the temperature do the melatonin rhythm in cultured chick pineal cells? *Am.J.Physiol.* **266**:R50-R58.



- ZAWILSKA, J.B. e IUVONE, P.M. (1992). Melatonin synthesis in the chicken retina: effect of kainic acid-induced lesions on the diurnal rhythm and D<sub>2</sub> dopamine receptor mediated regulation of serotonin N-acetyltransferase activity. *Neurosci.Lett.* **135**:71-74.
- ZAWILSKA, J.B. y NOWAK, J.Z. (1992). Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem.Int.* **20**:23-36.
- ZAWILSKA, J.B., KAZULA, A., ZURAWSKA, E. y NOWAK, J.Z. (1991). Serotonin N-acetyltransferase activity in chicken retina: *in vivo* effects of phosphodiesterase inhibitors, forskolin, and drugs affecting dopamine receptors. *J.Pineal Res.* **11**:116-122.
- ZEMAN, M. e ILLNEROVA, H. (1988). Rapid adjustment of the pineal N-acetyltransferase rhythm to change from long to short photoperiod in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J.Pineal Res.* **5**:565-571.
- ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. y FRIEDMAN, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**:425-432.

*Ahora, en el río confuso de las cosas  
que pasan eternamente,  
veo mi existencia como algo que ha sido,  
y que ha llegado a su devenir.  
Ahora, la soledad no me entristece,  
ni me asustan los murmullos misteriosos del campo,  
ni el graznido de la corneja.  
Y así sigo, con la chaqueta al hombro,  
por este camino que yo no he elegido,  
cantando, silbando, tarareando.  
Y cuando el destino quiera interrumpirlo,  
que lo interrumpa.  
Yo, aunque pudiera protestar, no protestaría.*